

**Untersuchungen zur Synthese
einer Partialsequenz der Streptococcen-
Protease (EC 3.4.22.10) nach der
klassischen Methode**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
vorgelegt
dem Fachbereich Chemie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**von
Andreas Raschig
aus Hofgeismar**

Marburg/Lahn 1975

**Untersuchungen zur Synthese
einer Partialsequenz der Streptococcen-
Protease (EC 3.4.22.10) nach der
klassischen Methode**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
vorgelegt
dem Fachbereich Chemie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**von
Andreas Raschig
aus Hofgeismar**

Marburg/Lahn 1975



Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 16.6.1975

Tag der mündlichen Prüfung am 25.6.1975

Dekan: Prof.Dr.Ch.Reichardt

Berichterstatter: Prof.Dr.Fr.Schneider

Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.Follmann

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof.Dr.Fr.Schneider am Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg/Lahn in der Zeit von März 1973 bis April 1975 angefertigt.

Meinem Lehrer, Herrn Prof.Dr. Friedhelm Schneider, danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche und vielseitige Förderung und die großzügige Unterstützung, die er mir während der Arbeit zuteil werden ließ.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof.Dr.Fr. Schneider und der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken, daß sie mir den Besuch des 4. Amerikanischen Peptidsymposiums 1975 in New York ermöglicht haben.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abkürzungen und Symbole für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate richten sich nach den von der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur herausgegebenen Regeln:

J.Biol.Chem. 241, 2491-95 (1966); 247, 977-83 (1972)

Biochem. 14, 449-62 (1975)

weitere Abkürzungen:

MBzl	4-Methoxybenzyl
S-t-But	S-tert.-Butylmercapto
Thp	2-Tetrahydropyranyl
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	N,N'-Dicyclohexylharnstoff
HBT	1-Hydroxybenzotriazol
NMM	N-Methylmorpholin
TÄA	Triäthylamin
TFA	Trifluoressigsäure
DMF	Dimethylformamid
EtOAc	Äthylacetat
EtOH	Äthanol
HAc	Essigsäure
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
MeOH	Methanol

A	Allgemeiner Teil	
1.	Einleitung	1
2.	Synthesepäne und Literaturübersicht	5
2.1.	Synthesepan für das Dodaceptid der Sequenz 12-23, Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-	5
2.1.1.	Wahl des Carboxylschutzes	6
2.1.2.	Wahl der Kupplungsmethoden	6
2.1.3.	Wahl des α -Aminoschutzes	8
2.1.4.	Wahl des Seitenkettenschutzes	9
2.1.4.1.	Spezielle Wahl des SH-Schutzes	10
2.1.4.2.	Spezielle Wahl des Imidazol-Schutzes	12
2.1.5.	Aufbau von Sequenz 12-23 durch Fragmentkondensation der Sequenzen 12-15, 16-18 und 19-23	13
2.1.6.	Synthese des Dodecapeptides als p-Nitrobenzylester	14
2.2.	Synthesepan des Tricosapeptides Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala	15
2.3.	Syntheseschemata 1-7	17
3.	Synthese der verschiedenen Teilpeptide	22
3.1.	Oktapeptid His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala	22
3.1.1.	Stufenweise Kondensation	22
3.1.2.	Fragmentkondensation	26
3.2.	p-Nitrobenzylester der Sequenz 16-23 His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala durch stufenweise Kondensation	27
3.3.	Synthese der Fragmente	28
3.3.1.	Fragment 16-18, His-Cys-Val	28

3.3.2.	Fragment 12-15, Ala-Ala-Thr-Gly	32
3.4.	Fragmentkondensation zum Tricosapeptid der Sequenz Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser- Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys- Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala	34
3.5.	Vorbereitung zur Synthese der gesamten Partialsequenz der Streptococcen-Protease (EC 3.4.22.10)	40
4.	Ergebnisse und Diskussion	42
4.1.	Carboxylschutz	42
4.2.	Kupplungsmethoden für die schrittweise Synthese unter Beibehaltung des Carboxyl- schutzes	43
4.3.	Kupplungsmethoden für die Darstellung aktivierter Teilsequenzen	44
4.4.	Einflüsse der verschiedenen SH-Schutz- gruppen	47
5.	Ausblick	48
B	Experimenteller Teil	
1.	Material und Methoden	50
2.	Verzeichnis der Literaturpräparate	52
3.	Versuchsanleitungen	56
3.1.	Cysteinderivate	56
3.2.	Sequenz 16-23 (His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala- Thr-Ala)	57
3.3.	Sequenz 16-18 (His-Cys-Val)	68
3.4.	Sequenz 12-15 (Ala-Ala-Thr-Gly)	76
3.5.	Kondensation der Teilsequenzen zur Gesamt- sequenz 1-23	82

3.6.	Vorbereitung zur Synthese der gesamten Partialsequenz 1-27	95
3.6.1.	Sequenz 19-23 (Ala-Thr-Ala-Thr-Ala)	95
3.6.2.	Synthesen zur Sequenz 24-27 (Gln-Ile- Met-Lys)	99
C	Literaturverzeichnis	100

Zusammenfassung

1. Die vorliegende Arbeit liefert einen weiteren Beitrag zur Synthese einer Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptococcen-Protease (EC 3.4.22.10) mit der Sequenz Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys,
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
die die essentielle SH-Gruppe des Enzyms enthält.

2. Die Synthesen wurden nach dem klassischen Verfahren der Peptidchemie auf dem Wege der Fragmentkondensation durchgeführt. Die Hauptprobleme der Strategie der Synthese, d.h. der Wahl der Teilstücke und Schutzgruppen, ergaben sich aus den Löslichkeitsschwierigkeiten der Fragmente. Im einzelnen wurden in der Arbeit die nachstehend aufgeführten Strategien durchgetestet.

3. Der zunächst versuchte stufenweise Aufbau der Teilsequenz 12-23 mit freier Carboxylgruppe scheiterte an der Schwerlöslichkeit des Hexapeptides 18-23, das noch mit guter Aminosäureanalyse erhalten aber nicht verlängert werden konnte. Bessere Ergebnisse wurden erhalten durch Beibehaltung des Carboxyl-Schutzes in Form des p-Nitrobenzylesters. So konnte einmal über den geschützten Peptidester der Sequenz 19-23 hinaus durch stufenweise Verlängerung der Kette durch jeweils eine Aminosäure die Sequenz 16-23 dargestellt werden. Gleichzeitig wurde dieses Syntheseprinzip ab der Sequenz 19-23 durch eine Fragmentkondensation abgelöst, welche folgende Teilstücke umfaßte:
Fragment 1-10; 12-15; 16-18; 19-23; 24-27.
Gln 11 mußte als einzelne Aminosäure eingeführt werden.

4. Fragment 1-10, das aus früheren Arbeiten als Acylpeptid vorlag, konnte in guter Ausbeute als p-Nitrophenylester erhalten werden und stand damit als kupplungsfähige Komponente zur Verfügung.

5. Die Fragmente 12-15; 16-18 und 19-23 wurden auf jeweils zwei Wegen erhalten:

a) Start mit dem p-Nitrobenzylester der carboxylendständigen Aminosäure und Verwendung von DCCI/Hydroxybenzotriazol in Dimethylformamid als Kupplungsmethode. Im Falle des Peptides 16-18 wurde mit freiem Valin gestartet und die Kupplung von Cystein und Histidin über p-Nitrophenylester durchgeführt. Die Acylpeptide wurden dann in die aktiven Ester übergeführt.

b) Start mit den p-Nitrophenylestern der carboxylendständigen Aminosäuren und Verlängerung der Ketten mit DCCI in Chloroform.

Beide Synthesewege lieferten identische Produkte. Die besseren Ausbeuten ergab der unter b) beschriebene Weg.

6. Die Frage nach dem bestgeeigneten Thiolschutz des Cysteins und sein Einfluß auf die Löslichkeit der Peptide wurde mit der S-tert.-Butylmercapto-, 2-Tetrahydropyranyl- und p-Methoxybenzyl-Schutzgruppe untersucht. Der 2-Tetrahydropyranyl-Schutz ist nur geeignet, wenn der als Aminoschutz verwendete tert.-Butyloxycarbonyl-Rest mit 3N HCl/Dioxan abgespalten wird. Der S-tert.-Butylmercapto- und p-Methoxybenzylrest genügten den Anforderungen an hohe Selektivität der Abspaltbarkeit, doch besitzen die mit der p-Methoxybenzyl-Gruppe versehenen Peptidderivate die besten Kristallisationseigenschaften und sind entsprechend besser aufzuarbeiten. Die Löslichkeitseigenschaften der Peptidderivate verschlechtern sich in der Reihenfolge S-tert.-Butylmercapto-, 2-Tetrahydropyranyl-, p-Methoxybenzyl-Rest; ihr Einfluß verliert sich mit wachsender Kettenlänge.

7. Mit dem p-Methoxybenzyl-Rest als Thiolschutz konnten die Teilsequenzen 1-10, 12-15, 16-18 und 19-23 zum Tricosapeptid 1-23 über die p-Nitrophenylester kondensiert werden; Gln 11 wurde ebenfalls über den p-Nitrophenylester einge-

führt. Alle entscheidenden Zwischenstufen waren in Dimethylformamid löslich und die Kondensationsreaktionen verliefen in guten Ausbeuten.

8. Die ersten Ergebnisse zur Darstellung der Sequenz 24-27 unter Verwendung der m-Chlorbenzyloxycarbonyl-Gruppe als ϵ -Aminoschutz des carboxylendständigen Lysins werden beschrieben und die Möglichkeiten einer Fragmentkondensation am festen Träger angesprochen.

A Allgemeiner Teil

1. Einleitung

Unter den funktionellen Gruppen der Enzyme, die für ihre Wirkung als biologische Katalysatoren von Bedeutung sind, besitzen die SH-Gruppe des Cysteins und der Imidazolrest des Histidins eine besondere Bedeutung (1)(2). Die herausragende Stellung dieser Gruppen bei der Enzymkatalyse ist in den chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften der Thiofunktion und des Imidazolrestes begründet. Hier spielen u.a. die nucleophile Reaktivität, die Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, Metallkomplexen sowie energiereichen Acylderivaten, das Redoxverhalten der SH-Gruppe und die Protonendonator- und acceptoreigenschaften des Imidazols eine Rolle (3)(4)(5).

Die an sich schon vielseitigen chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften der SH-Gruppe (6) und des Imidazols (7) werden in den Proteinen durch die Mikroumgebung und durch Nachbargruppeneffekte in verschiedener Richtung modifiziert und variiert. Die Probleme wurden außer an den makromolekularen Proteinen auch mit Erfolg an niedermolekularen Modells-substanzen studiert. Modelluntersuchungen betrafen z.B. die katalytischen Eigenschaften des Imidazols (8) und von SH-Verbindungen (9), sowie die Wirkung von Nachbargruppeneffekten auf die Geschwindigkeit hydrolytischer Prozesse (10).

Besonderes Interesse beansprucht die Frage, wie sich die Eigenschaften der Thiofunktion und des Imidazolrestes gegenseitig beeinflussen und welche Effekte eine Kooperation beider Gruppen bei katalytischen Prozessen bewirkt. Dieses Problem wurde an niedermolekularen Imidazol/SH-Verbindungen eingehend studiert (11)(12)(13) und führte zu dem Ergebnis, daß die nucleophile Reaktivität einer SH-Gruppe durch einen ideal benachbarten Imidazolrest, vermut-

lich über eine labile Wasserstoffbrücke, erhöht werden kann (14).

Die konsequente Fortsetzung dieser Studien war der Übergang von niedermolekularen Modellverbindungen zu höhermolekularen mit Peptidcharakter, die die Brücke zu den Proteinen herstellen. Für dieses Vorhaben bot sich eine Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptococcen-Protease (EC 3.4.22.10) an, die eine essentielle SH-Gruppe sowie einen für die Katalyse erforderlichen Imidazolrest enthält (15).

1969 begannen Schaich und Schneider (16) mit Versuchen zur Synthese dieser Partialsequenz bestehend aus 27 Aminosäuren in der aufgeführten Reihenfolge:

Val	Lys	Pro	Gly	Glu	Gln	Ser	Phe	Val	Gly	Gln	Ala	Ala	Thr
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Gly	His	Cys	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Gln	Ile	Met	Lys	
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	

Die Synthese der Sequenz, die acht trifunktionelle Aminosäuren enthält, erwies sich als sehr schwierig und konnte trotz verschiedener strategischer Ansätze bisher nicht zum erfolgreichen Ende geführt werden. Erste Versuche zum Aufbau des Peptides nach der Merrifield-Synthese (17)(18) (19) an einem Stück führten zu einem unbrauchbaren Produkt mit sehr schlechter Aminosäureanalyse (20). Einer der Gründe für den Mißerfolg dieser Synthese ist darin zu sehen, daß der ϵ -Benzyloxycarbonylrest des Lysins, das carboxylendständige Aminosäure ist, gegen die zur Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppen bei den einzelnen Syntheseschritten erforderlichen Bedingungen nicht stabil ist und dadurch Verzweigungen an der deblockierten ϵ -Aminogruppe des Lysins entstehen. Das konnte in eingehenden Studien über die Stabilität verschiedener ϵ -Aminoschutzgruppen am Lysin bewiesen (21) und bei der Synthese der Gesamtsequenz nach Austausch des Lysins gegen Glycin bestätigt werden (20). Die Sequenz mit aminoendständigem Glycin besaß eine erheblich bessere Aminosäureanalyse, genügte aber dennoch nicht den Ansprüchen, die man an die Reinheit eines Produktes stellen muß,

dessen physikalisch-chemischen und katalytischen Eigenschaften studiert werden sollen.

Auch ein Versuch, der eine Kombination der klassischen Fragmentkondensation und der Festphasensynthese darstellte, führte nicht zum Erfolg (20). Die nicht zu bewältigenden Probleme dieser Strategie stellten die zum Teil sehr schlechten Ausbeuten und die außerordentliche Schwerlöslichkeit einiger Peptidfragmente dar. Deshalb wurde eine klassische Synthese über eine Fragmentkondensation von fünf auf klassischem Wege synthetisierten Teilpeptiden bei Verwendung verschiedener Schutzgruppen versucht (22). Die anfänglich erfolgversprechende Strategie scheiterte aber in der Endphase an Löslichkeitsschwierigkeiten trotz verschiedener Variationen und Kombinationen der Schutzgruppen.

Für das weitere Vorgehen boten sich nun zwei Möglichkeiten an.

1. Eine erneute klassische Synthese unter Änderung der Wahl der Schnittstellen und damit der Struktur der Teilpeptide.
2. Eine Kombination der Festphasensynthese mit der klassischen Synthese, bei der lösliche, auf klassischem Wege synthetisierte Teilpeptide an festem Träger verknüpft werden (23)-(26), wodurch das mit wachsender Kettenlänge auftretende Löslichkeitsproblem entfällt. Diese Art der Festphasensynthese bietet außerdem den Vorteil, daß die Zahl möglicher Teil- und Rumpfsequenzen erheblich reduziert und damit die Reinigung des Endproduktes erleichtert und die Ausbeute mit Sicherheit erhöht wird.

Die vorliegende Arbeit greift das unter 1. genannte Konzept auf und befaßt sich mit der klassischen Synthese eines aus 23 Aminosäuren bestehenden Teilstückes unter Verwendung verschiedener Schutzgruppen vor allem an der Thiofunktion des Cysteins.

Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse zur Synthese von lös-

lichen Teilpeptiden können dann auch zur Darstellung der gesamten Partialsequenz der Streptococcen-Protease 1-27, sowohl nach der klassischen Methode als auch durch Fragmentkondensation am festen Träger (27), hilfreich sein.

2. Synthesepläne und Literaturübersicht

Wie bereits in der Einleitung kurz erwähnt wurde, war die Strategie der bisher durchgeführten klassischen Synthesen durch die Zerlegung der Gesamtsequenz in fünf Fragmente folgender Struktur gekennzeichnet (22): Val-Lys-Pro-Gly, Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly, Gln-Ala-Ala-Thr-Gly, His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala, Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys. Diese Aufteilung der Sequenz bot sich auf Grund des Glycingehaltes der Peptidkette an; drei der Peptide besitzen ein carboxylendständiges Glycin und stehen damit für alle Kupplungsmethoden ohne Racemisierungsgefahr offen.

Abweichend von diesem Konzept wird in der vorliegenden Arbeit eine neue Strategie eingeschlagen, die von dem Ziel ausgeht, zunächst ein Mittelstück zu synthetisieren, das die für physikalisch-chemische und katalytische Studien essentiellen Aminosäuren Cystein und Histidin enthält (28). Sollten sich die Eigenschaften dieses Mittelstückes, bestehend aus dem Fragment 12-23 als günstig erweisen, stand die Möglichkeit zu einer Verlängerung zunächst am Aminoende offen.

2.1. Syntheseplan für das Dodecapetid der Sequenz 12-23 Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala

Der Aufbau der Sequenz 12-23 wurde im Prinzip nach vier verschiedenen Schemata durchgeführt, die Variationen in der Wahl der Kupplungsmethoden, der verwendeten Schutzgruppen sowie der Fragmente beinhalten. Die bei der Planung des Vorgehens zu berücksichtigenden Probleme lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

- 1.) Wahl des Carboxylschutzes
- 2.) Wahl der Kupplungsmethoden
- 3.) Wahl des α -Aminoschutzes
- 4.) Wahl des Seitenkettenschutzes, vor allem der SH-Schutzgruppe des Cysteins

5.) Wahl der Teilsequenzen für eine Fragmentkondensation

2.1.1. Wahl des Carboxylschutzes

Der Aufbau des Dodecapeptides sollte mit Ala-ONB x HBr (29) beginnen. Von der Benutzung des entsprechenden Methyl- bzw. Äthylesters (30) als Grundbaustein wurde abgesehen, da er in der Sequenz 16-21 bereits erhebliche Löslichkeitsprobleme aufwarf (22). Der gegen Flußsäure stabile 4-Picolylester (31) erschien ebenso wie der gegen Acidolyse labile t-Butylester (32) für den ausgewählten Syntheseweg ungeeignet.

2.1.2. Wahl der Kupplungsmethoden

Die Kupplungen der einzelnen N-acylierten Aminosäuren mit dem wachsenden Peptid sollten über ihre gut kristallisierbaren Aktivester, wie p-Nitrophenyl- (33)(34) und N-Succinimidester (35) erfolgen. Diese inzwischen sehr häufig angewendete Methode hat den Vorzug, daß sie hohe Ausbeuten liefert, im Gegensatz zur Azidkupplung (36)(38) kaum Nebenprodukte bildet und nicht wie die Carbodiimid-Methode (39) zu Racemisierungen führt (40)(41).

Das Problem der Racemisierung ist bei der Planung einer Synthese von großer Bedeutung, da die biologische Aktivität eines Peptides wesentlich von der L-Konfiguration aller Aminosäuren abhängt (42). Eine spätere Entfernung unerwünschter Isomeren gestaltet sich extrem schwierig (43).

Die Kupplung über gemischte (44)-(47) oder symmetrische Anhydride (48)(49) wurde nicht in Betracht gezogen, da die Carboxylkomponente in hohem Überschuß eingesetzt werden muß und es häufig zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte kommt.

Ein weiterer Punkt, der für eine Synthese mit p-Nitrophenyl-

estern spricht, ist die Möglichkeit, in wässrigen Lösungsmitteln arbeiten zu können (22), ohne daß eine Hydrolyse statt einer Aminolyse eintritt. Dieses Kriterium sollte sich später als sehr wichtig bei der Kondensation mit nur wasserlöslichen Peptiden herausstellen. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob 1-Hydroxybenzotriazol die Aminolyse von p-Nitrophenylestern positiv beeinflussen kann. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Geiger und König gemacht (50).

Eine Aktivierung als Tri- (51) bzw. Pentachlorphenylester (52)(53) oder Pentafluorphenylester (54) wurde ebenfalls nicht erwogen, da diese bei Kupplungsreaktionen leicht Racemate bilden können (55)(56) und die bei dem aufgestellten Syntheseplan vorgesehenen Boc-Aminosäureester besonders als Pentafluorphenylester meist als Öle anfallen (57) und gegenüber den p-Nitrophenylestern keine evidenten Vorteile besitzen (58). Über weitere Aktivester (59) liegen bisher nur wenig Erfahrungen vor.

Die schrittweise Verknüpfung über Aktivester wie am Beispiel des Sekretins nach Bodanszky und Mitarbeiter (60), sollte jedoch nicht auf das Threonin angewendet werden, da sein p-Nitrophenylester mit gleichzeitigem Boc-Schutz nur schwer kristallin gewonnen werden kann (61); ein Umstand, der für viele Aminosäurederivate mit einem zweiten Asymmetriezentrum zutrifft. Hier sollte die verbesserte Carbodiimid-Methode unter Zusatz eines Katalysators, wie 1-Hydroxybenzotriazol (HBT)(62) oder N-Hydroxysuccinimid (63) zum Zuge kommen, die ebenfalls bei der Synthese des Sekretins von König und Geiger (62) und des Glucagons von Wünsch und Mitarbeitern (64) erfolgreich benutzt wurden. Weitere Beispiele sind die Synthese des Human-proinsulins C nach Geiger und seiner Gruppe (65), nochmals die Synthese von Sekretin durch Wünsch und Mitarbeiter (66) oder die Synthese des Bradykinins und Analogen durch Young und Mitarbeiter (67). Die breite Anwendung dieser Methode zeigt, daß die Bildung von Racematen ausgeschlossen wird (68) und gleichzeitig bei

kurzer Reaktionsdauer zu hohen Ausbeuten führt (62).

In dieser Arbeit sollte ausschließlich 1-Hydroxybenzo-triazol als Katalysator verwendet werden, da Hydroxysuccinimid mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) zu unerwünschten Nebenprodukten führt (70)(71).

2.1.3. Wahl des α -Aminoschutzes

Von den vielen Möglichkeiten des Aminschatzes von Aminosäuren, wie Acyl-, Formyl-, Benzyl-Rest (72), Tosyl- (73), Phthalyl- (74) und der o-Nitrophenylsulfenyl- (Nps)-Rest (75)-(78) oder die Schutzgruppen des Urethantyps, wie z.B. 2-(p-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl- (Bpoc) (79), Adamantylloxycarbonyl- (Adoc) (80), Tertiäramyloxycarbonyl- (Aoc) (81), Isobornyloxycarbonyl-Rest (82), die verschieden substituierten und auch teilweise farbigen Benzyloxycarbonyl-Reste (83)(84) und die durch Photolyse abspaltbaren Gruppen 3,5'-Dimethoxy-1,1-dimethylbenzyloxycarbonyl- (Ddz) (85), 3,4,5-Trimethoxybenzyloxycarbonyl- (Z(OMe)₃) (86) und Nitroveratryloxycarbonyl- (Nvoc)-Gruppe (87) (weitere bespricht Wieland in einer Reihe von Übersichtsartikeln (88)), sollen die beiden geläufigsten Schutzgruppen verwendet werden. Es handelt sich um die auf Bergmann und Zervas zurückgehende Benzyloxycarbonyl- (Z)-Gruppe (89) und die von McKay und Albertson entwickelte t-Butyloxycarbonyl- (Boc)-Gruppe (90). Beide Schutzgruppen liefern gut zugängliche, kristalline Aminosäurederivate (91), und die Löslichkeit eines Peptides in organischen Lösungsmitteln wird durch sie günstig beeinflusst.

Neben den Darstellungsmethoden von Boc-Aminosäuren über das Fluorid (92), das labile Chlorid (93), das Isocyanat (94) (95) oder die Aktivester (96)-(99), wurde der Weg über das gut zu handhabende Azid gewählt (100)(101). Der Boc-Rest kann schonend durch Acidolyse in inerten Lösungsmitteln oder mit Trifluoressigsäure wieder entfernt werden, und die

Spaltprodukte behindern nicht die Reindarstellung des protonierten Amines.

Eine Z-Aminosäure, synthetisiert über Chlorameisensäurebenzylester (89), sollte jedoch nur vor einem Hydrogenolyseschritt eingesetzt werden, da ihre vollständige und selektive Abspaltung mit Bromwasserstoff in Eisessig bei Erhaltung des Carboxyl-Schutzes nur durch gleichzeitige aber unerwünschte Acetylierung der freien OH-Gruppe des Threonins erfolgen kann (102).

2.1.4. Wahl des Seitenkettenschutzes

Die im Gegensatz zum Serin relativ reaktionsträge OH-Gruppe des Threonins sollte ungeschützt bleiben. Bei der hier eingeschlagenen Strategie war die Verwendung des mit Isobutyl- leicht zugänglichen t-Butyläthers des Threonins (103) auf Grund seiner Säurelabilität nicht praktikabel, oder es hätten die extrem säurelabilen Bpoc- oder Nps-Aminosäurederivate (78)(79) synthetisiert werden müssen. Die aufwendige Synthese des Threoninbenzyläthers (104)(105) und seine wenig selektive Deblockierungsmöglichkeit mit Fluorwasserstoff (106) wurde nicht in Betracht gezogen.

Der Schutz der Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren sollte auch bei den noch folgenden Syntheseplänen nicht nach dem nur in wenigen Fällen erfolgreich angewendeten Prinzip des "over-protection" (Glucagonsynthese durch Wunsch 1967/68 (64)) erfolgen. Es wurde vielmehr ein Minimum an Seitenkettenschutz angestrebt (107).

Eine Hydrogenolyse wird nach Einführung von Z-Val (108) (Position 18) notwendig, wobei sowohl der Z- als auch der ONB-Rest entfernt werden (109). Auch wenn dieser Schritt die Löslichkeit des Hexapeptides für Folgereaktionen beeinträchtigen sollte, wurde eine spätere Entfernung des Esters durch Verseifung wegen ebenfalls möglicher Löslichkeitsprobleme,

unvollständiger Reaktion, damit auch geringer Ausbeute und erheblicher Racemisierungsgefahr ausgeschlossen (110).

Die so erhaltene freie Hexapeptidsäure mußte nun mit einem möglichst in wässrigen Lösungsmittelgemischen teilweise löslichem Cystein-Derivat verknüpft werden.

2.1.4.1. Spezielle Wahl des SH-Schutzes

Von vornherein ausgeschlossen wurden Thiol-Schutzgruppen, die mit Natrium in flüssigem Ammoniak (111) abgespalten werden müssen, wie z.B. die S-Alkyl-Gruppen (112) oder der S-Benzyl-Rest (113) und die Gruppen des S-Acyl-Typs, die durch Behandlung mit Alkali oder Aminolyse entfernt werden (114)-(117). Auch die Maskierung als S-Diphenylmethyl- (118) oder S-Trityl-Derivat (119), eine Weiterentwicklung der "Alkyl-Maskierung", ist wegen ihrer Labilität gegenüber Säuren nicht anwendbar. Der Schutz der Sulfhydryl-Funktion durch Thioacetalbildung, z.B. mit dem Benzylthiomethyl- (120) oder Acetamidomethyl-Rest (121)-(124) ist insofern problematisch, als die Abspaltung meist mit Schwermetallsalzen erfolgt (125) und diese schon als Spurenelemente die später zu untersuchende Imidazol-SH-Katalyse beeinflussen können (126).

Aus dem reichhaltigen Angebot der gemischten Disulfide, den "Bunte-Salzen" (127) und den S-Alkylmercaptocysteinen (128)-(131), von denen die meisten sehr genau auf einen möglichen Disulfidaustausch (132)(133) und seinen Mechanismus (134)-(136) untersucht worden sind, wurde der am geeignetsten erscheinende S-t-Butylmercapto- (S-t-But)-Rest ausgewählt (137)-(140). Bei diesem auch gegen Bromwasserstoff/Eisessig und gegen Trifluoressigsäure stabilen asymmetrischen Disulfid des Cysteins wird durch die raumerfüllende t-Butyl-Gruppierung ein oxydativer Angriff auf die Disulfidbindung erschwert und einer Disproportionierung in die symmetrischen

Disulfide entgegengewirkt.

Die selektive Abspaltung dieser Schutzgruppe kann durch Sulfitolyse (141) mit Natriumsulfit und Essigsäure erfolgen. Das entstehende "Bunte-Salz" wird dann mit Schwefelwasserstoff oder Mercaptoäthanol in das Cystein-Derivat überführt. Weiter besteht die Möglichkeit der Abspaltung mit "Clealand-Reagenz" (142) oder Mercaptoäthanol (143) (144).

Die Aktivierung des Boc-Cys(S-t-But) (137) sollte über den noch darzustellenden p-Nitrophenyl- oder den N-Succinimid-ester erfolgen, um die Kupplung an die fortschreitende Peptidkette zu ermöglichen.

Eine Alternative zum Schutz der Thiofunktion bot noch das von Holland und Cohen zur Insulinsynthese (145) erstmals eingesetzte und von Zahn (116) ebenfalls beschriebene S-Tetrahydropyranyl-(2)- (Thp)-Derivat. Entsprechende Akti-ester waren noch nicht synthetisiert, da schon die Vorstufen häufig nur als Öle anfallen (116).

Diese Schutzgruppe, die eventuell zur besseren Löslichkeit des darzustellenden Heptapeptides beiträgt, sollte außer mit wässrigen Säuren, mit Silbersalzen und auch mit Brom oder Jod abspaltbar sein (146). Diese Ergebnisse konnten aber in der Arbeitsgruppe von Zahn (147) an längeren Peptidketten nicht bestätigt werden. In beiden Arbeiten wird jedoch die gute Deblockierung mit Dirhodan hervorgehoben, die auf Lecher und Wittwer zurückgeht und hauptsächlich zur Synthese von asymmetrischen Disulfiden bzw. Cystein-Peptiden eingesetzt wurde (148).

Einschränkend ist zu sagen, daß der Thp-Schutz gegen Säurebehandlung nur dann resistent ist, wenn mit absolut wasserfreien Reagentien gearbeitet wird (149).

Die Verwendung von Cystin-Derivaten und somit die Synthese

von Leiterpeptiden hat nur in wenigen Fällen, wie z.B. bei der Insulin-Synthese durch Zahn und Mitarbeiter zum Erfolg geführt (150). Die sterische Hinderung bei der Synthese von Doppelketten garantiert keinen gleichmäßigen Aufbau, und die Löslichkeit solcher Peptide nahm mit zunehmender Kettenlänge in der Regel stark ab.

2.1.4.2. Spezielle Wahl des Imidazol-Schutzes

Als nächste Aminosäure war in Position 16 das Histidin einzuführen. Der Imidazol-Rest sollte zunächst geschützt werden, um die Löslichkeit des zu synthetisierenden Oktapeptides (16-23) positiv zu beeinflussen.

Das Im-Benzyl-Derivat (151) erfordert zur Abspaltung Natrium in flüssigem Ammoniak und schied von vornherein aus. Eine Reihe von Imidazol-Schutzgruppen wurden von Schaich (16) auf die Brauchbarkeit in der Merrifield-Synthese untersucht. Unter den Gesichtspunkten der Kupplungsausbeuten, der Stabilität und der Löslichkeit der einzusetzenden Histidin-Derivate lassen sich die dabei gesammelten Erfahrungen auch auf die hier angewendete Strategie übertragen.

Der Boc-His(Boc)-ONp (22) bildete bei dieser Modellstudie eindeutig das Derivat der Wahl. Nach der Acidolyse mußte das Peptid mit demaskierter Imidazol-Gruppe weiterverwendet werden. Diese Tatsache sollte sich aber nicht störend auswirken. Auch in früheren Arbeiten wurde, z.B. bei der Synthese des Corticotropins (152)(153) das am Imidazol ungeschützte Histidin mit Erfolg verwendet.

Sollte das so erhaltene Oktapeptid wider Erwarten gute Löslichkeitseigenschaften aufweisen, war an eine vollständige Synthese der Sequenz 12-23 weiter nach dem Prinzip des stufenweisen Aufbaues, wie in Syntheseplan 1 dargestellt, gedacht. Ansonsten wurde eine Kondensation mit dem p-Nitrophenylester des Tetrapeptides Boc-Ala-Ala-Thr-Gly (Sequenz

12-15) geplant. Die Synthese des aktivierten Peptidesters sollte aus dem entsprechenden p-Nitrobenzylester über die Peptidsäure mit p-Nitrophenol und DCCI erfolgen (Syntheseplan 1a). Eine Aktivierung des Glycins erschien dabei besonders günstig, da in diesem Fall auch andere schon aufgeführte Kupplungsmöglichkeiten zur racematfreien Verknüpfung verwendet werden können.

2.1.5. Aufbau von Sequenz 12-23 durch Fragmentkondensation der Sequenzen 12-15, 16-18 und 19-23

Eine weitere Alternative bot sich über die Kondensation dreier Teilsegmente mit den Aminosäuresequenzen 12-15, 16-18 und 19-23 an (Syntheseplan 2). Hierbei hätte das Problem der Schwerlöslichkeit des Heptapeptides mit dem aminoendständigen Cystein eventuell umgangen werden können.

Das Tripeptid His-Cys-Val sollte ausgehend von der ungeschützten Aminosäure Valin über die oben besprochenen Aktivester von Cystein und Histidin dargestellt werden, um es anschließend als Ganzes in den p-Nitrophenylester zu überführen (Syntheseplan 3) und auf dem als p-Nitrophenylester geschützten Valin aufbauend nach der Carbodiimid-Methode in Chloroform (159) synthetisiert werden (Syntheseplan 4).

Das aktivierte Tripeptid über zwei verschiedenen Synthesewege zu erhalten, war insofern von Interesse, als die optischen Drehwerte der erhaltenen Produkte verglichen werden können und eine Aussage zur gewählten Methode über eine eventuelle Racemisierung ermöglicht wird. Von besonderer Bedeutung war dieses Problem im Falle des Thp-Schutzes, da durch diesen ein weiteres Chiralitätszentrum in das Molekül eingeführt wird, was zu nicht reproduzierbaren Drehwerten führen könnte (154).

Weiterhin sollte auch an der Teilsequenz 12-15 (Ala-Ala-Thr-Gly) der eingeschlagene Weg über eine parallellaufende

Synthese auf eventuelle Racemisierung überprüft werden. So wurde dieses Tetrapeptid nicht nur ausgehend von Gly-ONB x HBr mit sowohl p-Nitrophenylester als auch DCCI/HBT aktivierten Aminosäuren synthetisiert (Syntheseplan 5), sondern ebenfalls auf der Grundlage des Glycin-p-nitrophenylesters als Carboxyl-Schutz mit DCCI in Chloroform versucht (Syntheseplan 6)(207)-(209).

2.1.6. Synthese des Dodecapeptides als p-Nitrobenzylester

Wie sich später herausstellen sollte, mußte auf Grund unlösbarer Löslichkeitsprobleme und daraus resultierenden Reinigungsschwierigkeiten die Sequenzen 18-23 bzw. 19-23 doch als p-Nitrobenzylester erhalten bleiben, um einen brauchbaren weiteren Synthesefortschritt erzielen zu können (Synthesepläne 1a und 2a). Durch diese Entscheidung ergaben sich für die weiteren Syntheseschritte keine Änderungen in Bezug auf die Planung, und es konnte nach dem beschriebenen Verfahren weitergearbeitet werden.

Da der p-Nitrobenzylester später durch Flußsäure entfernt werden muß (106), eine Verseifung wurde aus bereits beschriebenen Gründen nicht in Betracht gezogen und an eine katalytische Hydrogenolyse in flüssigem Ammoniak (155) oder an die Spaltung mit Bortribromid (156) war nicht gedacht, sollte der von Sakakibara zur Oxytocin-Synthese schon erfolgreich verwendete p-Methoxybenzyl- (MBzl)-Schutz für die SH-Gruppe (157) in die Synthese mit einbezogen werden (Synthesepläne 2a und 4). Weitere Anwendung fand diese Schutzgruppe auch bei der Insulin-Synthese (128)(158). Die Abspaltung des MBzl-Restes erfolgt ebenfalls durch die Behandlung mit Fluorwasserstoff (106).

2.2. Syntheseplan des Tricosapeptides 1-23

Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-
Ala-Thr-Gly-His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala

Unter Verwendung dreier verschiedener Thiol-Schutzgruppen sollte bei gelungener Synthese der Sequenz 12-23 über das Dodecapeptidderivat hinaus das Treidecapeptid 11-23 und durch weitere Ankondensation der bereits beschriebenen Sequenzen 5-10 und 1-4 (159) das gesamte Peptid der Sequenz 1-23 synthetisiert werden können (Syntheseplan 7).

Die Aktivierung der Teilstücke am Carboxylende sollte über die p-Nitrophenylester erfolgen, wobei das Glutamin in Position 11 einzeln als Boc-Gln-ONp (160) angekuppelt werden sollte. Diese Entscheidung hatte verschiedene Gründe.

1. Die trifunktionelle Aminosäure Glutamin sollte an ihrer Seitenkette ungeschützt bleiben, da bereits der an dieser Sequenz getestete Amidschutz mit einer p-Methoxybenzyl- und einer 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-Gruppe in der Synthese aufwendig ist und die Löslichkeit der Peptidderivate verringert statt verbessert wurde (161).

2. Bei der Weiterverarbeitung des Peptides mit ungeschützter Amidfunktion war keine sonst häufig auftretende Bildung eines Pyroglutaminsäurederivates (162)-(165) zu beobachten.

3. Die Peptidknüpfung bei freier Amidgruppe mit DCCI ist unmöglich, da diese Methode zur Dehydratisierung der Amidfunktion führt (62)(166).

Das Peptidfragment mit der Sequenz 5-10 war bereits als freie Peptidsäure synthetisiert worden (159). Da die Aminosäure Glycin carboxylendständig ist, stand die Wahl der Aktivierung wieder offen. Die Wahl fiel auch hier auf den p-Nitrophenylester, da eine Verknüpfung nach der Carbodiimid-Methode Schwierigkeiten bei der Reinigung des neuen eventuell schwer löslichen Peptides hätte geben können. Die Synthese des Tetrapeptides mit der Sequenz 1-4 ist bereits als p-Nitrophenylester beschrieben (159).

Sollte das mit diesem Peptid (Sequenz 1-4) zu verknüpfende Trifluoracetat des Nonadecapeptides mit der Sequenz 5-23 nicht in Dimethylformamid, ein Lösungsmittel, das sich bei der Synthese von Peptiden auch mit mehr als fünf Aminosäuren hervorragend bewährt hat, löslich sein, stand noch eine weitere Möglichkeit für die Synthese des Tricosapeptides offen. Dabei handelt es sich um das von Schaich bereits synthetisierte Decapeptid der Sequenz 1-10 (159). Dieses mußte noch in seinen p-Nitrophenylester verwandelt werden, um mit dem Trifluoracetat der Sequenz 11-23 zum vollständigen Tricosapeptid reagieren zu können.

2.3. Syntheseschemata

Syntheseplan 1

12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Ala	Ala	Thr	Gly	His	Cys	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala
										Boc	ONB
										Boc	DCCL/HBT
											ONB
									Boc (ONp)		ONB
									Boc	DCCL/HBT	ONB
								Boc			ONB
								Boc	DCCL/HBT		ONB
								Boc (ONp)			ONB
								Boc	DCCL/HBT		ONB
											ONB
								Z-ONp			ONB
								S-tBut			ONB
								Boc OSu Z			ONB
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								S-tBut			OH
								Boc			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc	DCCL/HBT		OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc			OH
								S-tBut			OH
								Boc ONp			OH
								Boc		</	

Syntheseplan 2: Sequenz 12-23

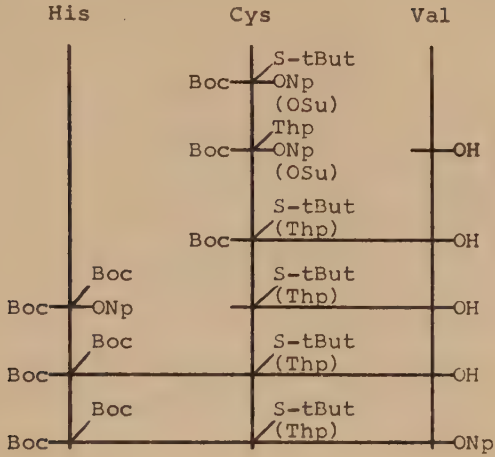
Ala	Ala	Thr	Gly	His	Cys	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala
							Z-ONp				ONB
				Boc	S-tBut (Thp)		Z				ONB
				Boc	S-tBut (Thp)	ONp					OH
				Boc	S-tBut (Thp)						OH
Boc			ONp		S-tBut (Thp)						OH
Boc					S-tBut (Thp)						OH

Syntheseplan 2a: Sequenz 12-23

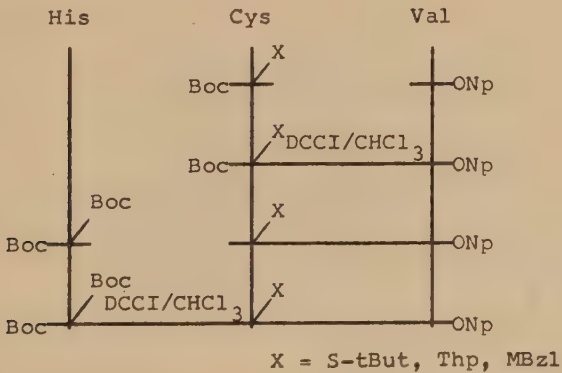
Ala	Ala	Thr	Gly	His	Cys	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala
					X		Boc				ONB
				Boc	X	ONp					ONB
				Boc	X						ONB
				Boc	X						ONB
Boc			ONp		X						ONB
Boc					X						ONB

X = S-tBut, Thp, MBzl

Syntheseplan 3: Sequenz 16-18



Syntheseplan 4: Sequenz 16-18



Syntheseplan 5: Sequenz 12-15

Ala	Ala	Thr	Gly
		Boc	ONB
		Boc	DCCI/HBT ONB
	Boc	ONp	ONB
	Boc	(DCCI/HBT)	ONB
Boc	ONp		ONB
Boc	(DCCI/HBT)		ONB
Boc			OH
Boc			ONp

Syntheseplan 6: Sequenz 12-15

Ala	Ala	Thr	Gly
		Boc	ONp
		Boc	DCCI/CHCl ₃ ONp
	Boc		ONp
	Boc	DCCI/CHCl ₃	ONp
Boc			ONp
Boc	DCCI/CHCl ₃		ONp

Synthesepplan 7 : Sequenz 1-23

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Val	Lys	Pro	Gly		Glu	Gln	Ser	Phe	Val	Gly	Gln	Ala	Ala	Thr	Gly	His	Cys	Val	Ala	Thr	Ala	
											Boc						X					ONB
										Boc-ONp							X					ONB
					Boc				OH Boc								X					ONB
					Boc				ONp								X					ONB
					Boc												X					ONB
					Boc												X					ONB
					ONp												X					ONB
	Z																X					ONB
	Z																X					ONB

X = S-tBut, Thp, MBzl

Syntheseplan 7a :

[illegible]

3. Synthese der verschiedenen Teilpeptide

3.1. Oktapeptid His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala

3.1.1. Stufenweise Kondensation

Zur stufenweisen Synthese des Oktapeptides der Sequenz 16-23 wurde mit dem p-Nitrobenzylester des Alanins am Carboxylende begonnen. Die Verknüpfung mit der nächsten Aminosäure, dem Threonin, erfolgte nach der Carbodiimid-Methode unter Zusatz des Katalysators HBT, wobei DCCI mit 10% Überschuß und HBT in äquimolarer Menge eingesetzt wurden. Diese Methode lieferte hier, wie auch bei der Anknüpfung von Threonin in den Positionen 20 und 14 reproduzierbare optische Drehwerte und führte immer zu guten Ausbeuten.

Die jeweiligen Kupplungen mit Alanin in den Positionen 21, 19, 13 und 12 wurden auf zwei verschiedenen Wegen durchgeführt.

a) In Abwandlung der Peptidknüpfung mit Aminosäure-p-nitrophenylestern, wie sie bisher üblich und von Schaich (22) ausschließlich durchgeführt wurde, trat noch der Katalysator HBT hinzu. Dieses Verfahren wird von König und Geiger beschrieben (167). Es hat gegenüber dem "alten" Verfahren den Vorzug, die Reaktionszeit zu verkürzen, die Aminolyse also zu beschleunigen; es führte aber nicht oder nur in geringem Maße zur Erhöhung der Ausbeute.

b) Es wurde dieselbe Methode angewendet wie zur Verknüpfung des Threonins, also mit DCCI unter Zusatz des Katalysators HBT.

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß beide Verfahren für die jeweiligen Produkte identische Drehwerte lieferten und in Bezug auf ihre Anwendbarkeit zur Synthese optisch aktiver Peptide völlig gleichwertig sind. Unterschiede ergaben sich jedoch in ihren Ausbeuten (Tabelle 1). Danach ergibt die Carbodiimid-Methode eindeutig höhere Ausbeuten.

Die gleichen Ergebnisse wurden bei der Verknüpfung mit Boc-Val zur Synthese des Hexapeptides erhalten. Ein Vergleich mit dem Z-Val konnte nicht angestellt werden, da das entstehende Hexapeptidderivat während der Reaktion in Dimethylformamid ausfällt und die Entfernung entstehenden N,N'-Dicyclohexyl-Harnstoffes bei gleichen Löslichkeitseigenschaften sehr erschwert wird. Die Synthese ist also nur über den p-Nitrophenylester möglich.

Die Reinigung erfolgte für alle bis hier synthetisierten vollgeschützten Peptide durch Umkristallisation aus Äthanol mit Petroläther oder allein aus Äthanol.

Die Boc-Schutzgruppe wurde bis einschließlich des Tripeptides mit 1N HCl/Dioxan abgespalten. Bei zunehmender Aminosäureanzahl mußte die Acidolyse mit Trifluoressigsäure vorgenommen werden, da die Löslichkeit in HCl/Dioxan stark begrenzt war. Beide Wege lieferten mit hohen Ausbeuten hygroskopische Salze, die nur mit absolutierten Lösungsmitteln umzufällen, selten umzukristallisieren waren. Bei fortschreitender Peptidlänge reduzierten sich diese Schwierigkeiten allerdings.

Um auf der Basis der freien Carboxylgruppe die Synthese fortzuführen, wurde der N-Benzylloxycarbonyl-hexapeptid-p-nitrobenzylester in Dimethylformamid über Palladium/Aktivkohle hydriert. Die entstehende voluminöse freie Peptidsäure konnte nur durch reichliche Zugabe von Wasser und leichtem Erwärmen in Lösung gehalten werden, um eine vollständige Hydrogenolyse zu erzielen. Gleichzeitig mußte aber darauf geachtet werden, daß das Ausgangsprodukt nicht ausfiel. Die Reinigung der Peptidsäure gelang durch Umkristallisation aus Wasser.

Die für die Fragmentkondensation benötigte freie Pentapeptidsäure (Sequenz 19-23), sie wurde zunächst ebenfalls mit Z-Schutz als p-Nitrobenzylester synthetisiert, konnte durch Hydrogenolyse in warmem Äthanol wiederum unter Zugabe von

Wasser dargestellt werden. Sie ist auch in kaltem Wasser löslich und wurde durch Zufügen von Methanol umkristallisiert.

Ernste Schwierigkeiten traten bei dem Versuch auf, verschiedene Cysteinderivate mit der freien Hexapeptidsäure zu verknüpfen. Einerseits ist diese nur in Wasser und dort auch nur sehr begrenzt löslich und fällt unter Zusatz eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels wie Dimethylformamid sofort vollständig aus. Andererseits war man gezwungen, mit Lösungsmittelgemischen zu arbeiten, denn alle synthetisierten Cysteinderivate, die mit S-t-But- und Thp-Resten geschützten p-Nitrophenylester des Boc-Cysteins und der Succinimidester des S-t-But-Derivates, sind in Wasser unlöslich. Sie beginnen auszufallen, wenn der Wasseranteil 40-50% übersteigt.

Da unter den schweren Löslichkeitsverhältnissen die Reaktionsgeschwindigkeiten extrem herabgesetzt sind, tritt gleichzeitig in vermehrtem Maße eine unvermeidbare Nebenreaktion, die Hydrolyse der Ester, ein. Diese zusätzliche Erscheinung erforderte den Einsatz der Cystein-Derivate in zwei bis vierfachem Überschuß, was in keinem Verhältnis zum Aufwand der Synthese dieser Derivate stand.

Weiter erschwerend erwies sich ein anderer Punkt. Die Aminolyse verläuft am günstigsten im neutralen bis schwach alkalischen Bereich (168). Das erfordert den Zusatz von Triäthylamin oder Natriumhydrogencarbonat in äquivalenten Mengen zur Peptidsäure, mit dem Nachteil, daß auch die Hydrolyse beschleunigt wird. Mit beiden Basen ergaben sich nur geringe Umsetzungen zur Heptapeptidsäure, ohne Basenzusatz konnte auch nach drei Tagen keine Reaktion auf chromatographischem Wege nachgewiesen werden.

Der Zusatz des Katalysators HBT wirkte im Falle des Succinimidesters reaktionshemmend, im Falle des p-Nitrophenylesters fand die Reaktion statt, lieferte aber an Rohprodukt nur

Ausbeuten unter fünf Prozent.

Da alle diese Versuche im Endergebnis unbefriedigend verliefen, wurde freie Hexapeptidsäure mit äquivalenter Menge Triäthylamin und Dimethylformamid zu einer gleichmäßigen Paste verrieben und mit zwei Äquivalenten des Boc-Cys-(S-t-But)-ONp (der Succinimidester versagte auch hier) wiederum unter Zusatz von HBT (ein Äquivalent) in Dimethylformamid eine Woche geschüttelt. Dabei bildete sich eine trübe Gallerte, aus der mit 60% Ausbeute das Produkt, verunreinigt mit Hexapeptid, isoliert werden konnte. Eine hundertprozentige Reinigung erwies sich auf Grund der geringen und der zum Hexapeptid ähnlichen Löslichkeitseigenschaften unmöglich.

So wurde das Produkt in unvollständig gereinigtem Zustand nach Überführung in das Trifluoracetat nach dem gleichen Prinzip zur Oktapeptidsäure weiterverarbeitet. Durch diese beiden Schritte wurden die Löslichkeitseigenschaften nur unwesentlich verändert, und es gelang nicht, weder auf der Stufe des Trifluoracetates noch auf der der Oktapeptidsäure, ein absolut sauberes Produkt zu erhalten.

Die Hepta- und auch die Oktapeptidsäure ließen sich durch Auskochen mit Wasser, dabei ging gleichzeitig ein geringer Teil in Lösung, nicht von ungeschütztem Hexapeptid befreien. Lediglich die Aufnahme in siedendem Dimethylformamid bringt einen Teil des gewünschten Produktes in Lösung, der beim Abkühlen wieder ausfällt. Bei dieser Prozedur wird jedoch unvollständig der N_{Im} - eventuell auch N_{α} - Boc-Schutz abgespalten, da diese Gruppe bei höherer Temperatur instabil ist. Im Chromatogramm waren zwei Pauly-positive Banden deutlich erkennbar, und es wurden eine gute Aminosäureanalyse aber völlig unbrauchbare Elementaranalysen erhalten.

Die Behandlung mit Trifluoressigsäure ergab chromatographisch ein einheitliches Produkt, soweit es sich von der Startlinie überhaupt entfernte. Die Aussagekraft einer

C,H,N-Analyse war inzwischen ohnehin in Frage gestellt, da durch zahlreiche Filtrationen und der Unmöglichkeit einer Umfällung das Produkt stark durch Filterpapierreste verunreinigt war.

In der Hoffnung, doch noch eine Änderung der Löslichkeit erzwingen zu können, wurde nach vorhergehendem Muster eine Umsetzung mit dem p-Nitrophenylester des Tetrapeptides mit der Sequenz 12-15 durchgeführt. Die entstandene Dodecapeptidsäure (Sequenz 12-23) war jedoch ebenso unlöslich und zudem chromatographisch uneinheitlich mit bis zu vier Pauly-positiven Banden. Auch die Tatsache, daß sich das Produkt teilweise in siedendem Dimethylformamid löste und beim Erkalten wieder ausfiel, erlaubte keine Reindarstellung.

So war deutlich geworden, daß eine Synthese des Dodecapeptides nach dem Prinzip der schrittweisen Kondensation auf der Grundlage eines ungeschützten Carboxylendes vor der Verknüpfung mit einem Cystein-Derivat nicht möglich ist.

3.1.2. Fragmentkondensation

Die Möglichkeit einer Fragmentkondensation der freien Peptidsäure der Sequenz His-Cys-Val (Sequenz 16-18), dessen Synthese noch beschrieben wird, wurde ebenfalls getestet. Durch diese Strategie wurde ausgeschlossen, daß das Histidin-Derivat zur Synthese des Oktapeptides nicht wie vorher neben der Reaktion mit Heptapeptidsäure zusätzlich mit Hexapeptidverunreinigung reagieren kann. Außerdem konnte die schwer lösliche und ungenügend zu reinigende Stufe des Heptapeptides übergangen werden.

Das zu diesem Weg benötigte Tripeptid wurde mit S-t-But- und Thp-Schutz als p-Nitrophenylester eingesetzt. Die Reaktion erfolgte wie vorne mit Zusatz von Triäthylamin und HBT in Dimethylformamid.

Auf Grund der in organischen Lösungsmitteln ebenso schwer löslichen freien Pentapeptidsäure war auch hier nur eine unvollständige Reaktion mit Ausbeuten bis maximal 13% zu beobachten. Die Reinigung erwies sich gleichfalls schwierig, da auch die freie Pentapeptidsäure nicht vollständig und unter gleichzeitiger teilweiser Lösung von Oktapeptidsäure mit Wasser ausgekocht werden kann. Die Aminosäureanalysen dieser "gereinigten" Peptidderivate ergaben dann auch deutlich, daß die Produkte noch mit durchschnittlich 20% Pentapeptid verunreinigt waren.

Die Fragmentkondensation mit freier Säuregruppe am Carboxylende erwies sich also zur Gewinnung der Oktapeptidsäure auch als untauglich, und es mußte ein neuer Syntheseweg eingeschlagen werden.

3.2. p-Nitrobenzylester der Sequenz 16-23 His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala durch stufenweise Kondensation

Da die Unlöslichkeit der bisher beschriebenen Peptide mit Sicherheit auf die ungeschützte Carboxylgruppe zurückzuführen war, wurde nochmals eine stufenweise Synthese unter gleichen Bedingungen aber unter Beibehaltung des p-Nitrobenzylesters durchgeführt. Dadurch sollte die Löslichkeit der verschiedenen Peptidderivate erheblich verbessert werden.

Die Umsetzung zum Heptapeptid-p-nitrobenzylester erfolgte ohne Schwierigkeiten mit hoher Ausbeute aus Boc-Cys(S-t-But)-ONp und dem Trifluoracetat des Hexapeptid-p-nitrobenzylesters (im Verhältnis 1,1 zu 1) in Dimethylformamid mit äquivalenten Mengen Triäthylamin und HBT. Das entstehende Heptapeptidderivat bleibt in Lösung und kann deshalb auch nach der Carbodiimid-Methode synthetisiert werden. Die Umkristallisation erfolgte einfach aus Äthanol.

Ein Versuch der Synthese über das Cystein-N-succinimidester-Derivat gestaltete sich weniger erfolgreich. Die Aminolyse

verlief ohne Katalysator wesentlich langsamer und wurde mit HBT in äquimolarer Menge vollständig gestoppt.

Die weitere Synthese zum Oktapeptidderivat konnte in Dimethylformamid aus dem Trifluoracetat des Heptapeptides und Boc-His(Boc)-ONp mit 10% Überschuß nach dem üblichen Verfahren durchgeführt werden. Das Produkt bildete in Dimethylformamid eine Gallerte, ließ sich aber gut nach Einrühren in Eiswasser aufarbeiten und aus Äthanol umfällen.

Die erstaunliche Verbesserung der Löslichkeit durch den p-Nitrobenzylester und damit die Möglichkeit der Reindarstellung erlaubte nun auch die Synthesen größerer Peptide bis hin zum Tricosapeptid der Sequenz 1-23. Allerdings wurde vom Plan der stufenweisen Kondensation abgesehen, da der Verlust an wachsendem Peptid bei jeder Reaktionsstufe zu unwirtschaftlich erschien, und es wurde die Verknüpfung von Peptidfragmenten vorgezogen.

3.3. Synthese der Fragmente

Die Darstellung der Sequenz 19-23 wurde bereits unter 3.1.1. beschrieben. Die Schwierigkeiten der Synthesewege und die Experimente zu den Sequenzen 1-4 und 5-10 bzw. 1-10 werden in loc.cit. (22) ausführlich behandelt. So müssen hier noch die Synthesen der Teilsequenzen 12-15 und 16-18 aufgeführt werden.

3.3.1. Fragment 16-18, His-Cys-Val

Zunächst wurde die Synthese mit der freien Aminosäure Valin begonnen, die in Wasser mit äquivalenter Menge Natriumhydrogencarbonat gelöst war und mit gleicher Menge Cysteinderivat (Boc-Cys(S-t-But)-OSu, -ONp und Boc-Cys(Thp)-ONp), gelöst in Dimethylformamid, vereint wurde. Hier bestand wieder die Schwierigkeit, daß das Valin teilweise ausfiel und die Re-

aktion bei schon sterisch ungünstiger Aminosäure zusätzlich behindert wurde. Die Ausbeuten lagen deshalb auch in Wiederholungsfällen für beide Produkte nur zwischen 50% und 60%.

Die Kristallisation des mit der S-t-But-Gruppe geschützten Dipeptides gelang nur mühsam aus Essigester durch vorsichtige portionsweise Zugabe von Petroläther und dauerte über mehrere Tage bis zu drei Wochen. Das aus dem p-Nitrophenylester gewonnene Dipeptid konnte auch durch Animpfen nicht kristallin erhalten werden. Das Thp-Derivat, ebenfalls nicht kristallisierbar, wurde als Öl weiterverarbeitet; die Gewinnung als Dicyclohexylammoniumsalz wurde nicht versucht. Nach Behandlung mit Chlorwasserstoff in Dioxan konnte das Produkt als feste, hygroskopische Substanz isoliert werden, war aber trotz mehrmaliger Umfällung im Gegensatz zum S-t-But-Derivat nicht chromatographisch rein darzustellen. Die folgende Umsetzung mit Boc-His(Boc)-ONp in Dimethylformamid erbrachte dann in beiden Fällen reine Tripeptide in ordentlichen Ausbeuten.

Wie aus der stufenweisen Kondensation schon zu ersehen, bildete das zu synthetisierende Oktapeptid 16-23 in Dimethylformamid eine Gallerte. Deshalb sollte die nun durchzuführende Fragmentkondensation nicht nach der Carbodiimid-Methode sondern über einen aktiven Ester vorgenommen werden, und die verschieden geschützten Tripeptidsäuren, die sich sowohl in Dimethylformamid als auch in Essigester sehr gut lösen, wurden mit DCCI in ihre p-Nitrophenylester überführt. Die Reinigung der entstandenen Produkte erwies sich allerdings als problematisch, da beide nur durch wiederholtes Fällern unter hohen Verlusten aus Äther mit schneller und reichlicher Zugabe von Petroläther rein dargestellt werden konnten. Die Ausbeute für das Thp-Derivat lag sogar nur unter 20%.

Die geringen Ausbeuten nach zwei von vier Synthesestufen ließen die Darstellungsmethode in Bezug auf die wertvollen Cystein-Derivate als ungeeignet erscheinen. Die gewonnenen physikalischen Daten für die Tripeptidderivate sollten aber

einen guten Anhaltspunkt für die Brauchbarkeit dieses oder eines zweiten Syntheseweges geben.

Die Alternative verlief nach einem schon von Schaich (159) an der Sequenz 1-4 erprobten Verfahren. Ausgehend von Val-ONp x HBr, der aktive Ester diente hier als Carboxylschutz (209), wurden die folgenden Peptidknüpfungen in Chloroform nach der Carbodiimid-Methode durchgeführt. Das wenig polare, aprotische Lösungsmittel Chloroform ermöglicht die Kupplung zu den entsprechenden Peptiden, ohne daß es zu Fehlsequenzen kommt, da p-Nitrophenylester ausschließlich in stark polaren Lösungsmitteln wie Dimethylformamid als Aktivester wirken (210). Die Ausbeuten der auf diesem Wege synthetisierten Peptide übertrafen die der vorhergehenden Methode bei weitem (Tabelle 1). Zusätzlich hat die Synthese in Chloroform den Vorzug, daß nicht erst noch die mit Verlusten verbundenen Darstellungen der Aminosäure- und Peptid-p-nitrophenylester vorgenommen werden müssen, so daß sie pro Aminosäure also einen Syntheseschritt weniger verlangt.

Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgte jeweils mit Chlorwasserstoff in Dioxan und lieferte analysenreine Peptid-hydrochloride. Auch im Falle des säurelabilen Thp-Schutzes wurde fast quantitativ einheitliches Produkt gewonnen. Weniger sauber waren die Ausgangsstufen, das Hydrochlorid bzw. Hydrobromid des Valin-p-nitrophenylesters. Hier erfolgte bei der Acidolyse der Boc-Gruppe anscheinend auch eine geringe Esterhydrolyse. Eine Reinigung durch mehrfache Umkristallisation war nicht möglich. Die Verunreinigung behinderte jedoch nicht die Reindarstellung der folgenden Syntheseprodukte. Allerdings war in jedem Fall darauf zu achten, daß die Salze in absolut trockenem Zustand eingesetzt wurden.

Da die Synthese der Peptide in Chloroform nicht nur hohe Ausbeuten sondern auch reproduzierbare optische Drehwerte lieferte (Tabelle 2), wurden als Thiolschutz neben den S-t-But- und Thp-Gruppen auch die MBzl-Gruppe eingesetzt. Mit ihr konnten ebenfalls gut kristallisierbare Peptidderi-

vate in hohen Ausbeuten gewonnen werden. Die Verwendung mehrerer verschiedener Schutzgruppen gab gleichzeitig Gelegenheit, Vergleiche ihrer Einflüsse auf die Löslichkeit und ihrer Abspaltbarkeit auch im größeren Peptidverband anzustellen.

Die hervorragende Eignung des zuletzt beschriebenen Syntheseweges gab Anlaß zu einem weiteren Versuch. Um den Verlust an wertvollem Cystein-Derivat durch mehrere Synthesestufen möglichst gering zu halten, wurden vier verschiedene Cystein-Derivate (Boc-Cys(MBzl)-ONp, Boc-Cys(Thp)-ONp, Boc-Cys(S-t-But)-ONp, (Boc-Cys-ONp)₂) durch Acidolyse in ihre Hydrochloride überführt, um anschließend die Dipeptid-p-nitrophenylester-Derivate (Sequenz 16-17, His-Cys) darstellen zu können. Dadurch sollte ein weiterer Syntheseschritt zum darauf folgenden Oktapeptid (Sequenz 16-23) für die Aminosäure Cystein erspart bleiben.

Leider führte aber die Umsetzung zum Hydrochlorid in allen vier Fällen, auch bei halber Konzentration von Chlorwasserstoff in Dioxan außer zum gewünschten Produkt zum entsprechenden Cystein- bzw. Cystin-Derivat mit freier Carboxylgruppe im Verhältnis eins zu eins. Die Trennung dieser beiden Komponenten durch Umkristallisation aus Methanol/Äther gelang nicht. Die Reinigung durch Säulenchromatographie wurde nicht versucht.

Erklärt wird die Erscheinung der erhöhten Esterhydrolyse durch die unmittelbare Nachbarschaft eines Schwefelatoms, das die Nebenreaktion offensichtlich positiv beeinflusst. Quantitative Untersuchungen über den Katalyseeffekt auf die Säurehydrolyse des aktiven Esters bei verschiedenen Thiol-Schutzgruppen und Esterkomponenten stehen noch aus.

3.3.2. Fragment 12-15, Ala-Ala-Thr-Gly

Diese Sequenz sollte zur Fragmentkondensation als p-Nitrophenylester vorliegen, da nicht sicher war, ob das damit zu knüpfende Dodecapeptid (Sequenz 12-23) in Dimethylformamid löslich ist und daher eine Reinigung von anfallendem Harnstoffderivat bei der Anwendung der Carbodiimid-Methode erschwert sein würde.

Die stufenweise Synthese erfolgte wieder auf der Grundlage des p-Nitrobenzylesters als Carboxylschutz und die einzelnen Boc-Aminosäuren wurden mit DCCI unter Zusatz äquivalenter Mengen von HBT angekuppelt. Hier, wie auch schon bei der Synthese der Sequenz 19-23 bzw. 18-23, wurden die Peptide in sehr guten Ausbeuten isoliert und standen auch in Bezug auf ihre optische Reinheit den mit Aminosäure-p-nitrophenylester gewonnenen Syntheseprodukten (22) in keiner Weise nach (Tabelle 2).

Anschließend wurde der Tetrapeptid-p-nitrobenzylrest unter Beibehaltung des Boc-Schutzes durch Hydrogenolyse über Palladium/Aktivkohle in Methanol in das Säurederivat überführt. Dieser Syntheseschritt verlief schnell und ohne Komplikationen. Das Produkt konnte gleich nach Filtration aus der Methanol-Lösung durch Zugabe von Äther gefällt und aus Methanol mit Äther umkristallisiert werden.

Die Synthese des p-Nitrophenylesters erfolgte in Dimethylformamid mit p-Nitrophenol (20% Überschuß) und DCCI (10% Überschuß). Diese Umsetzung führte häufig, besonders bei Ansätzen größer als 0,02 molar, zu nicht näher identifizierten Nebenprodukten und unvollständiger Reaktion. Die Reinigung durch Umkristallisation aus Methanol oder Äthanol erwies sich nicht als vorteilhaft, da zur vollständigen Lösung zum Sieden erhitzt werden mußte und unter diesen extremen Bedingungen die Neigung zur Methyl- bzw. Äthylester-Bildung bestand. Zusätzlich mußte dieser Vorgang mehrmals wiederholt werden. Die Umfällung aus Äthanol mit Äther und Petroläther

zeigte nur einen minimalen Reinigungseffekt. So konnte der p-Nitrophenylester nur in Ausbeuten um 30% gewonnen werden. Schnellere Reinigung wurde durch Eingießen einer Äthanol-Lösung in Eiswasser erzielt. Allerdings muß das ausgefallene Produkt sofort abgesaugt werden, um eine Esterhydrolyse zu vermeiden.

Da die Überführung dieses Tetrapeptides in den p-Nitrophenylester mit hohen Verlusten verbunden war, wurde noch die Synthese nach der Carbondiimid-Methode in Chloroform mit der p-Nitrophenyl-Gruppe als Carboxylschutz durchgeführt (208).

Aus Gly-ONp x HCl oder Gly-ONp x HBr wurde Boc-Thr-Gly-ONp in guter Ausbeute analytisch rein dargestellt. Das daraus gewonnene, stark hygroskopische Hydrochlorid mußte aus absolutem Methanol und Äther umkristallisiert und innerhalb weniger Tage weiterverarbeitet werden, da es nach kurzer Zeit chromatographisch nachweisbar das entsprechende Diketopiperazin (169) bildete.

Die Umsetzung zum Tripeptidester mit Boc-Ala verlief wieder reibungslos, mußte zur Reindarstellung aber mehrmals aus Essigester/Petroläther und Äthanol/Äther umkristallisiert werden. Die Behandlung mit Chlorwasserstoff in Dioxan lieferte das aus abs. Äthanol/abs. Äther umkristallisierbare und lagerfähige Salz.

Die Synthese des folgenden Tetrapeptides warf in der Aufarbeitung Probleme auf. Bei dieser Umsetzung löste sich nicht nur das Hydrochlorid des Tripeptides wie fast alle Salze unvollständig in Chloroform, sondern es fiel auch das Produkt schon während der Reaktion teilweise aus. Dadurch war die Reinigung vom N-N'-Dicyclohexylharnstoff besonders erschwert, zumal das Peptidderivat in Essigester unlöslich ist. Die mehrmalige Umkristallisation aus Äthanol mit Äther lieferte dann mit nur ca. 60% Ausbeute den t-Butyloxycarbonylpeptid-p-nitrophenylester.

Trotzdem waren bei gleichen physikalischen Daten die Ausbeuten bis zu dieser Synthesestufe erheblich besser als über den vorher beschriebenen Syntheseweg.

Abschließend ist zu diesem empfehlenswerten Syntheseweg zu sagen, daß die Neutralisation der eingesetzten Hydrochloride nicht wie sonst mit Triäthylamin sondern mit N-Methylmorpholin erfolgte. Es vermindert die Gefahr der Oxazolone- und damit der Diastereomerenbildung der eingesetzten N-t-Butyloxycarbonyl-aminosäuren und ist weniger geeignet, den p-Nitrophenylester durch nucleophilen Angriff zu spalten. Der Grund ist in der wesentlich geringeren Basizität und der sterischen Hinderung des N-Methylmorpholins in Chloroform zu suchen (170). Diese Tatsache ist umso wichtiger, da in Chloroform bei Verwendung des p-Nitrophenyl-Carboxylschutzes der die Racemisierung senkende Katalysator HBT nicht eingesetzt werden kann.

3.4. Fragmentkondensation zum Tricosapeptid der Sequenz Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala- Ala-Thr-Gly-His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala

Für alle Kondensationsschritte, die dem Syntheseplan 8 zu entnehmen sind, wurde Dimethylformamid als Lösungsmittel verwendet, die Trifluoracetate mit äquivalenter Menge Triäthylamin neutralisiert und der Katalysator HBT in äquivalenter Menge zur Carboxylkomponente zugesetzt. Der Zusatz von HBT stellte bei der Fragmentkondensation eine echte Hilfe dar, zumal alle zu verwendenden Peptid-Trifluoracetate in Dimethylformamid löslich waren. In diesem Lösungsmittel erzielt der Katalysator nämlich seine maximale Wirkung (169), und er erlaubt eine fast quantitative Umsetzung zu den gewünschten Peptiden, wobei für den einzusetzenden p-Nitrophenylester jeweils nur 10% Überschuß benötigt wurden.

Der erste Kondensationsschritt zum Oktapeptid der Sequenz 16-23 erfolgte mit dem p-Nitrophenylester der Sequenz 16-18

X = S - tBut, Thp, MBzl

(His-Cys-Val) und mit dem Trifluoracetat des Pentapeptid-p-nitrobenzylesters der Sequenz 19-23. Als Thiol-Schutz dienten die S-t-But-, Thp- und die MBzl-Gruppe.

Die drei Oktapeptidderivate konnten in reiner Form mit durchschnittlich 70% Ausbeute isoliert werden. Die verschiedenen Schutzgruppen erforderten auf Grund ihres unterschiedlichen Einflusses auf die Löslichkeit verschiedene Aufarbeitungsmethoden. Die S-t-But- und Thp-Peptidderivate waren in Dimethylformamid löslich und konnten durch Einrühren in Eiswasser gewonnen werden. Im Gegensatz zum Thp-Derivat ließ sich das Peptid mit S-t-But-Schutz sogar noch aus Äthanol umkristallisieren. Die mit dem MBzl-Rest geschützte Verbindung fiel schon während der Reaktion in Dimethylformamid aus und mußte durch Auswaschen mit verschiedenen Lösungsmitteln gereinigt werden.

Die Umsetzung zum Bis-Trifluoracetat gelang ohne Schwierigkeiten mit Ausbeuten um 90%. Allerdings blieben bei einem Versuch zur Umkristallisation des mit der Thp-Gruppe geschützten Peptides ca. 60% in Äthanol ungelöst. Dabei handelt es sich um eine Verbindung, die sich chromatographisch und mit einem Schmelzpunkt von 242-43°C vom eigentlichen Produkt unterscheidet. Eine freie Thiol-Gruppe, die durch Acidolyse des bedingt säurelabilen Thp-Restes entstehen könnte, konnte mit Ellmann-Reagens (171) nicht nachgewiesen werden; eventuell handelt es sich um das Cystin-Peptidderivat. Die genaue Identifizierung wurde noch nicht vorgenommen.

Ein Versuch, einheitliches Oktapeptidderivat mit dem Thp-Schutz zu erhalten, wurde mit Bortrifluorid-Ätherat/Eisessig (172) zur selektiven acidolytischen Abspaltung der Boc-Gruppe neben dem Tetrahydropyranyl- bzw. Trityl-Rest (173)(174) durchgeführt, die ihrerseits mit Bortrifluorid-Ätherat über die Carbinole eingeführt werden können (119). Obwohl dieses Verfahren die Gefahr der Acylierung der β -Hydroxy-Gruppe des Threonins in sich birgt und auch die Hydrolyse des p-Nitrobenzylesters nicht vollständig ausgeschlos-

sen werden kann (173), wurde ein schwach braun gefärbtes aber chromatographisch einheitliches und mit dem Trifluoracetat identisch laufendes Produkt gewonnen. Bei einer Wiederholung dieses Hydrolyseschrittes sollte also diese Methode der Spaltung mit Trifluoressigsäure vorgezogen werden.

Die verschiedenen Bis-Trifluoracetate waren in Dimethylformamid löslich und reagierten nach der Neutralisation mit Triäthylamin mit dem Tetrapeptid-p-nitrophenylester der Sequenz 12-15 glatt zum Dodecapeptid. Die Isolierung erfolgte für alle drei Derivate durch Eingießen in Eiswasser und sorgfältiges Waschen des ausgefallenen Produktes mit Äthanol, Essigester, Äther und Petroläther. Eine Umkristallisation war in keinem Fall möglich, da die Löslichkeit jeweils gleich schlecht war. Nur in warmem Hexamethylphosphorsäuretriamid war eine vollständige Lösung zu beobachten.

Da die Ausbeute für das Peptid mit Thp-Schutz lediglich 30% betrug, die beiden anderen lagen bei 70%, und ein weiterer Verlust durch die Trifluoressigsäure-Behandlung vermieden werden sollte, wurde hier für das Dodecapeptid mit dieser Schutzgruppe der weitere Syntheseweg abgebrochen. Außerdem ergab ein Versuch zur Abspaltung des Boc-Restes vom Dodecapeptid mit Thp-Schutz durch Bortrifluorid-Ätherat/Eisessig ein schwer absaugbares, dunkelbraunes Produkt, das chromatographisch nicht einheitlich war. Dieser Umstand ist erklärlich. Die Behandlung mußte zur vollständigen Lösung des Dodecapeptides auf zwei Stunden statt zehn Minuten verlängert und die Temperatur statt Raumtemperatur auf 50°C erhöht werden. Unter diesen Bedingungen erhöht sich die Gefahr des Auftretens oben genannter Nebenreaktionen erheblich.

Der nun folgende Reaktionsschritt, die Freisetzung der endständigen Aminogruppe der Dodecapeptide mit S-t-But- und MBzl-Schutz lieferte analysenreine, in Dimethylformamid lösliche Bis-Trifluoracetate. Es war sogar eine Umkristallisation aus Äthanol möglich. Durch eine Nachfällung mit Äther wurden Ausbeuten um 90% erzielt.

Diese Verbindungen wurden nun nicht mit einem Peptidfragment sondern Boc-Gln-ONp umgesetzt. Die Reaktionsansätze bildeten nach der Neutralisation mit Triäthylamin dickflüssige Gallerten. Die Reaktionszeit betrug deshalb auch ebenso wie bei der Synthese der Dodecapeptide zwei bis drei Tage. Das Tri-decapeptid mit S-t-But-Schutz läßt sich nach dem Eingießen in Eiswasser nur schwer auf einer Nutsche sammeln, da es zunächst das Filter passiert, dann aber vollständig verstopft und einen glasig schmierigen Filterkuchen bildet. Die Isolierung ist deshalb durch Zentrifugation zu empfehlen. Eine Umkristallisation ist nicht möglich, die Löslichkeit in siedendem Dimethylformamid ist gering.

Das Peptidderivat mit MBzl-Schutz konnte am besten durch Einrühren in Äthylacetat gewonnen werden, wo es einen besser absaugbaren, flockigen Niederschlag bildete und durch Waschen mit Äther und Petrolöther in einen feinen, amorphen Zustand überging. Löslich ist die Verbindung nur in warmem Hexamethylphosphorsäuretriamid.

Die Umsetzung zum Bis-Trifluoracetat gelang wieder fast quantitativ. Um die Gefahr der Pyroglutaminsäure-Bildung zu umgehen, wurde auf eine Umkristallisation verzichtet und das Produkt nur mit Äther sorgfältig gewaschen und sofort weiterverarbeitet.

Der sich anschließende Hexapeptid-p-nitrophenylester der Sequenz 5-10 (Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly) wurde aus der freien Säure mit p-Nitrophenol (40% Überschuß) und DCCI (10% Überschuß) synthetisiert. Das Produkt, das bei häufiger Umkristallisation aus Äthanol durch Bildung von Äthylester gefährdet war, konnte nicht vollständig frei von nicht umgesetzter Säure isoliert werden.

Der Reaktionsansatz für das zu synthetisierende Nonadecapeptid bildete nach Triäthylamin-Zusatz wieder ein Gel, das zwei Tage geschüttelt werden mußte, um einen möglichst vollständigen Umsatz zu erzielen. Auch dieses Peptid wurde zur

Isolierung in Äthylacetat eingegossen. Da die Carboxylkomponente mit 65% Überschuß eingesetzt wurde, waren zu ihrer Entfernung eine erneute Aufnahme in Dimethylformamid bis zur Bildung eines klaren Gels und die entsprechende Aufarbeitung notwendig. Das Produkt konnte nach Behandlung mit Äther bei einer Ausbeute von 72,5% als weißes, nur in warmem Hexamethylphosphorsäuretriamid lösliches Pulver gewonnen werden.

Das daraus dargestellte Bis-Trifluoracetat mit aminosäureendständigem Glutaminsäure- γ -benzylester war nicht mehr in Dimethylformamid oder Hexamethylphosphorsäuretriamid löslich. Als zur Lösung auf 40-50°C erwärmt wurde, dieser Vorgang dauerte über eine Stunde, hatte sich quantitativ das Pyroglutaminsäure-Derivat gebildet. Damit war die Synthese des Tricosapeptides nach dieser Strategie unmöglich. Es blieb also nur noch die Umsetzung des Tridecapeptides der Sequenz 11-23 mit dem p-Nitrophenylester des Decapeptides der Sequenz 1-10 übrig.

Die Überführung der in Dimethylformamid löslichen Decapeptidsäure Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH in den p-Nitrophenylester gelang mit der doppelten Menge p-Nitrophenol und DCCI mit 50% Überschuß. Das Reaktionsprodukt konnte durch Einrühren der Dimethylformamid-Lösung in Äthylacetat gefällt werden. Die Reinigung durch Waschen mit den üblichen Lösungsmitteln und Abzentrifugieren ergab ein analysenreines lockeres Pulver in guter Ausbeute.

Für die folgende Reaktion wurde der Decapeptidester mit 15% Überschuß eingesetzt. Sonst waren die Reaktionsbedingungen dieselben wie zur Synthese des Nonadecapeptides. Das Reaktionsprodukt war eine fest zusammenhängende Gallerte, die in Äthanol eingerührt werden konnte und einen flockigen, lediglich abzentrifugierbaren Niederschlag bildete. Nach etlichen Waschvorgängen konnte das Tricosapeptidderivat analysenrein als feines Pulver mit einer Ausbeute von 71% gewonnen werden. Es war nur noch schwer in warmem Hexamethylphosphorsäuretriamid löslich und blieb bei der Dünnschichtchromatographie

in allen getesteten Laufmitteln auf der Startlinie sitzen oder ergab erhebliche Schwanzbildung.

3.5. Vorbereitung zur Synthese der gesamten Partialsequenz der Streptococcen-Protease (EC 3.4.22.10)

In Vorbereitung zur Synthese der gesamten Partialsequenz der Streptococcen-Protease wurden inzwischen weitere Vorstufen für eine Fragmentkondensation des Heptacosapeptides nach der in dieser Arbeit erfolgreich eingeschlagenen Strategie dargestellt.

Es handelt sich um die Synthese des Pentapeptid-p-nitrophenylesters der Sequenz Ala-Thr-Ala-Thr-Ala, die über drei verschiedene Wege möglich war. Diese sind den Syntheseplänen 9, 10 und 11 zu entnehmen. Es wurden danach keine "neuen" Syntheseprinzipien benutzt. Sie gaben aber die Möglichkeit, an einem weiteren Beispiel optische Drehwerte und Ausbeuten vergleichen und die Methoden überprüfen zu können.

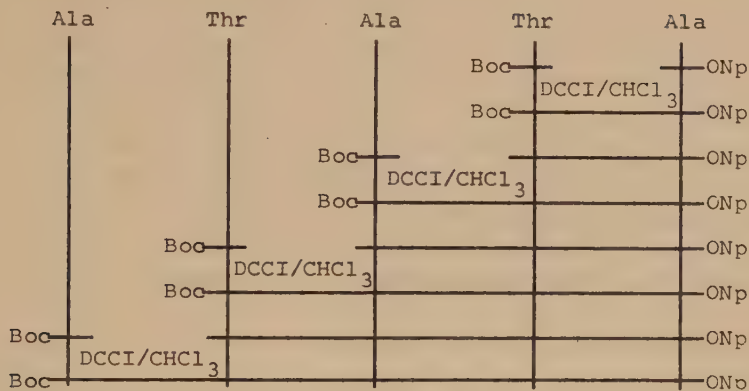
Syntheseplan 9: Sequenz 19-23

	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	
Boc						ONB
Boc						OH
Boc						ONp

Syntheseplan 10: Sequenz 19-23

	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	
				Boc		ONp
Boc			ONB	Boc		ONp
Boc			OH			ONp
Boc			DCCI/CHCl ₃			ONp

Syntheseplan 11: Sequenz 19-23



Die Darstellung des Pentapeptid-p-nitrophenylesters nach Syntheseplan 9 verlief ohne nennenswerte Schwierigkeiten. Die Kupplung eines Tri- und eines Dipeptides nach der Carboxydiimid-Methode in Chloroform (Syntheseplan 10) war mit großem Substanzverlust verbunden, da das Produkt gleichzeitig mit N,N'-Dicyclohexylharnstoff ausfiel und die Aufarbeitung entsprechend erschwert wurde. Der schrittweise Aufbau mit dem p-Nitrophenylester als Carboxylschutz (Syntheseplan 11) mußte auf Grund der Schwerlöslichkeit in Chloroform auf der Stufe des Tetrapeptides abgebrochen werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die bisherigen Versuche zur Synthese der Partialsequenz der Strptococcen-Protease (EC 3.4.22.10) waren an der nicht vorhersehbaren Unlöslichkeit der synthetisierten Teilsequenzen gescheitert (22). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, die Sequenz 1-23 unter Auslassung der Sequenz 24-27 zu synthetisieren. Das Tetrapeptid wurde nicht in die Synthese einbezogen, da es bereits Löslichkeitsprobleme aufwarf und zudem ein optimaler selektiver Schutz der -Aminogruppe des Lysins gewisse Probleme aufwarf.

4.1. Carboxylschutz

Die Synthese des Dodecapeptides der Sequenz 12-23 auf der Grundlage des ungeschützten Carboxylendes führte auch in dieser Arbeit auf Grund der extremen Löslichkeitsprobleme nicht zum Erfolg. Dieses Problem begann bereits bei der Einführung des Cysteins in Position 17 und konnte bei der fortschreitenden Synthese nicht behoben werden. Ebenso erfolglos war die Synthese über die Fragmentkondensation, obwohl dadurch etliche mit Löslichkeitsproblemen behaftete Syntheseschritte umgangen werden konnten.

Erfolgreich gestaltete sich dagegen die Synthese unter Beibehaltung des p-Nitrobenzylesters als Schutz am Carboxylende. Die Löslichkeit der einzelnen Syntheseprodukte nach der stufenweisen Kondensation und der Fragmentkondensation wurden durch den p-Nitrobenzylrest so günstig beeinflusst, daß sogar für alle Peptidderivate eine Umkristallisation möglich war und die Synthese bis zum Tricosapeptid weitergeführt werden konnte. Dieser Carboxylschutz, der meist gleichzeitig die Kristallisation positiv beeinflusst, ist auch für einen erneuten Syntheseversuch zur gesamten Partialsequenz zu empfehlen, auch wenn dadurch zur späteren Freisetzung der Carboxylgruppe die Behandlung mit Fluorwasserstoff notwendig wird.

Weiterhin vorteilhaft erwies sich auch die Unterteilung der Peptidfragmente in Sequenzen mit carboxylendständigem Glycin, da die Peptide ohne Gefahr der Racemisierung in ihre p-Nitrophenylester überführt werden können.

4.2. Kupplungsmethoden für die schrittweise Synthese unter Beibehaltung des Carboxylschutzes

Bei der Verknüpfung über die p-Nitrophenylester konnte bestätigt werden, daß der Zusatz des Katalysators HBT sowohl bei der schrittweisen Synthese als auch bei der Fragmentkondensation die Aminolyse beschleunigt und die Ausbeuten erhöht. Ein Verlust an wertvollen Peptiden konnte damit in Grenzen gehalten werden. Zusätzlich konnten Ausgangsverbindungen und Produkte wegen unterschiedlicher Löslicheitseigenschaften auch im Falle von schwer löslichen Produkten gut voneinander getrennt werden. Dadurch war die für die Weiterverarbeitung unbedingt notwendige Reindarstellung der Peptide möglich.

Neben dieser Standard-Methode der Fragmentkondensation über p-Nitrophenylester/1-Hydroxybenzotriazol in Dimethylformamid wurde für die schrittweise Verknüpfung parallel auch die Carbodiimid-Methode unter Zusatz von HBT in Dimethylformamid als Lösungsmittel verwendet. So konnten direkte Vergleiche zur Ausbeute und vor allem zur optischen Reinheit der Syntheseprodukte angestellt werden.

In Tabelle 1 sind die optischen Drehwerte der einzelnen Substanzen, die auf den beiden verschiedenen Wegen synthetisiert wurden, gegenübergestellt. Aus den nahezu identische Ergebnissen läßt sich ersehen, daß beide Methoden in Bezug auf ihre Ansprüche an die optische Reinheit gleichwertig sind. Vergleicht man jedoch die in Tabelle 1 auch aufgeführten Ausbeuten, so ist der Carbodiimid-Methode unter Zusatz von HBT in Dimethylformamid eindeutig der Vorzug zu geben, zumal jeweils ein Syntheseschritt, nämlich die oft mit Verlusten

verbundene Darstellung der Aminosäure-p-nitrophenylester entfällt.

Kupplungsmethode in DMF	DCCI,HBT	p-Nitro- phenyl- ester	DCCI,HBT	p-Nitro- phenyl- ester
Peptid	$[\alpha]_D^{24}$ (c=1, DMF)		Ausbeute (%)	
Boc-Ala-Thr-Ala-ONB	-20,6	-20,3	87	83
Boc-Ala-Thr-Ala-Thr- Ala-ONB	-18,8	-19,6	95	70
Boc-Val-Ala-Thr-Ala- Thr-Ala-ONB	-18,7	-18,4	58	54
Boc-Ala-Thr-Gly-ONB	-11,1	-11,3	79	75
Boc-Ala-Ala-Thr-Gly- ONB	-15,2	-15,2	81	90

Tabelle 1: Drehwerte und Ausbeuten der Peptide, die über zwei verschiedene Kupplungsmethoden synthetisiert worden sind

4.3. Kupplungsmethoden für die Darstellung aktivierter Teilsequenzen

Nicht immer glatt und deshalb zur Reindarstellung mit Verlusten verbunden, verlief die Synthese der p-Nitrophenylester aus den Peptidsäuren (Methode A). Besonders unerfreulich verlief dieser Syntheseschritt bei einem Tripeptidderivat der Sequenz 16-18 (His-Cys-Val) mit nur 14% Ausbeute. Durchschnittlich lagen die Ausbeuten der nach dieser Methode synthetisierten Peptid-p-nitrophenylester bei 50%, ein Wert, der für wirtschaftlich zu nennende Synthesen nicht akzeptiert werden kann. Lediglich die Überführung der Sequenz 1-10 in ihren p-Nitrophenylester ergab mit 82% eine gute Ausbeute.

Diese Tatsache machte die bereits geplante zweite Synthesemethode unbedingt notwendig. Die auf den Hydrobromiden bzw. Hydrochloriden der carboxylendständigen Aminosäure-p-nitrophenylester in Chloroform mit DCCI aufgebauten Peptide (Methode B) der Sequenzen Ala-Ala-Thr-Gly, His-Cys-Val und Ala-Thr-Ala-Thr-Ala sowie die von Schaich bereits beschriebene Sequenz Val-Lys-Pro-Gly (159) zeigten eindeutig bessere Erfolge in Bezug auf die erzielten Ausbeuten.

In Tabelle 2 sind die verschiedenen Ergebnisse einschließlich der von Schaich gefundenen Werte für die Sequenz 1-4 (Val-Lys-Pro-Gly) zusammengestellt.

Kupplungsmethode Lösungsmittel	A DMF	B CHCl ₃	A DMF	B CHCl ₃
Peptid	[α] _D ²⁴ (c=1, DMF)		Ausbeute (%)	
Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-ONp	-45,2	-43,7	10	53
Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp	-22,2	-21,4	13	28
Boc-His(Boc)-Cys-(S-t-But)-Val-ONP	-59,2	-62,6	14	60
Boc-His(Boc)-Cys-(Thp)-Val-ONp	-37,2	-37,1	3	42
Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONp	-14,2	-20,4	23	13

Tabelle 2: Drehwerte und Ausbeuten (bezogen auf das Salz der ersten Aminosäure) verschiedener Peptid-p-nitrophenylester, die nach den Methoden A und B (siehe Text) synthetisiert worden sind.

Daraus ist zu entnehmen, daß der Gewinn an Ausbeute nach der Methode B durchschnittlich 30% beträgt. Außerdem ist hier zu bemerken, daß etliche Syntheseschritte, nämlich die Darstellung eines vorläufigen Carboxylschutzes und die Voraktivierung der Aminosäuren, ausfallen.

Ein Problem, das die guten Ergebnisse der Strategie nach Methode B hätte schmälern können, ist die Gefahr der Diastereomerenbildung, da der die Racemisierung senkende Katalysator HBT in Chloroform seine Wirkung verliert und nicht eingesetzt werden kann (68). Trotzdem gelang es, die verschiedenen Peptid-p-nitrophenylester nach dieser Methode mit annähernd gleichen optischen Drehwerten darzustellen (Tabelle 2). Dieser Erfolg, der zu einer breiteren praktischen Anwendung dieser Methode führen sollte, ist letzten Endes der Verwendung der Base N-Methylmorpholin zuzuschreiben, die im Gegensatz zum Triäthylamin in Chloroform eine viel geringere Basizität besitzt (170).

Beschränkender Faktor dieses Syntheseweges ist die Löslichkeit der Peptidderivate in Chloroform. So wurde beobachtet, daß bereits die Tetrapeptide neben N,N'-Dicyclohexylharnstoff während der Reaktion teilweise ausfielen und die Reinigung entsprechend erschwert wurde. Besondere Schwierigkeiten in dieser Richtung ergaben sich bei der Synthese der Sequenz Ala-Thr-Ala-Thr-Ala.

Die Abspaltung des α -Aminoschutzes von Aminosäure-p-nitrophenylestern lieferte auch nach häufiger Umkristallisation immer leicht verunreinigte Salze; der folgende Syntheseschritt wurde dadurch aber nie behindert. Anders sah es für verschiedene Cystein-Derivate des Typs Boc-Cys(X)-ONp, X = S-t-But, Thp, MBzl, Cys, aus. Hier fand eindeutig gleichzeitig eine teilweise Säurehydrolyse des Esters statt, die offensichtlich durch den Cystein-Schwefel katalysiert wird. Die beiden Produkte, die jeweils im Verhältnis 1:1 entstanden, konnten durch Umkristallisation nicht getrennt werden, und ein Peptidaufbau auf dieser Aminosäure nach dem beschriebenen Prinzip (Methode B) war deshalb nicht möglich.

Methionin, das als carboxylendständiger p-Nitrophenylester zur Synthese des letzten Fragments (Sequenz 24-27) benötigt wurde (Syntheseplan 12), ließ sich dagegen wieder wie die

Aminosäurederivate von Alanin, Glycin und Valin in das Hydrochlorid überführen. Die Säurehydrolyse des aktiven Esters kann also nur durch das an das β -C-Atom gebundene und nicht durch ein später folgendes Schwefelatom herbeigeführt werden.

4.4. Einflüsse der verschiedenen SH-Schutzgruppen

Die Verwendung verschiedener Thiol-Schutzgruppen erbrachte in mehreren Punkten Aufschlüsse.

1. Die Löslichkeitseigenschaften der verschiedenen Peptidderivate wurden nur beschränkt beeinflusst. Bei dem Oktapeptid der Sequenz 16-23 sank die Löslichkeit in der Reihenfolge der S-t-But-, Thp-, MBzl-Gruppe. Der MBzl-Rest zeigte aber die besten Kristallisationseigenschaften und war bei der Aufarbeitung entsprechend gut zu handhaben. Beim Dodecapeptid der Sequenz 12-23 waren die Eigenschaften schon sehr ähnlich; die Wirkung einer Schutzgruppe im größeren Peptidverband geht also verloren.
2. Die optische Aktivität der Cystein-Peptidderivate blieb durch Einführung eines zweiten Chiralitätszentrums wie im Falle des Thp-Schutzes reproduzierbar. Das galt für Nachsynthesen der Peptide ebenso wie für auf verschiedenen Wegen synthetisierte Endprodukte (Tabelle 2).
3. Die Stabilität der Thiol-Schutzgruppen ist unterschiedlich zu bewerten. Der MBzl-Rest ist bekannterweise nur durch Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak oder mit Fluorwasserstoff abspaltbar, hält also den hier verwendeten Verfahren stand. Für den S-t-But-Schutz gilt das gleiche, da er nur durch Reduktion mit Natrium in Ammoniak, durch Mercaptane mit entsprechendem Reduktionspotential oder durch Sulfitolyse entfernt werden kann. Die Stabilität der Thp-Gruppe bleibt gegenüber wasserfreier Säurebehandlung fraglich. So konnten die entsprechenden zum Tripeptid His-Cys-Val führen-

den Derivate ohne Schwierigkeiten hergestellt werden. Die Synthese des Oktapeptid-bis-trifluoracetates (Sequenz 16-23) war jedoch mit großen Verlusten verbunden. Das heißt, mit 3N HCl/Dioxan wurde Erhalt und mit Trifluoressigsäure Abspaltung dieses Restes erzielt. Ein Versuch, die Trifluoressigsäure durch Bortrifluorid-Ätherat/Eisessig zu ersetzen, führte nicht zu den gewünschten Resultaten, da die Löslichkeit des Dodecapeptides (Sequenz 12-23) in diesem Reagens bereits stark begrenzt war.

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, daß unter Beibehaltung des p-Nitrobenzylrestes als Carboxylschutz die MBzl-Gruppe als Thiol-Schutz verwendet werden sollte. Eine gleichzeitige Abspaltung kann dann in Fluorwasserstoff erfolgen.

Mit dem MBzl-Rest als Thiol-Schutz konnte in dieser Arbeit nach dem Prinzip der Fragmentkondensation das Tricosapeptid der Sequenz 1-23 erfolgreich synthetisiert werden. Schwierigkeiten ergaben sich lediglich, als sich das Nonadecapeptid-bis-trifluoracetat (Sequenz 5-23) nicht in kaltem Dimethylformamid lösen ließ. Als das Lösungsgemisch erwärmt wurde, cyclisierte der aminoendständige Glutamin- γ -benzylester vollständig zum Pyroglutaminsäurederivat.

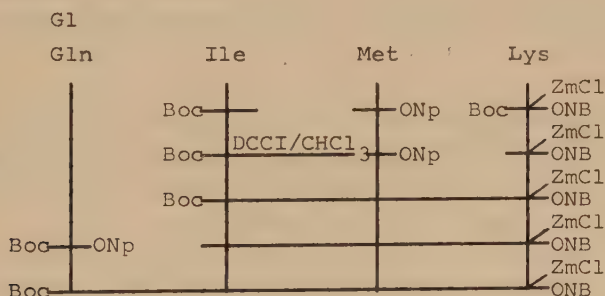
Aus diesem Grund war es notwendig, die in Dimethylformamid lösliche Sequenz 1-10 als p-Nitrophenylester darzustellen und anschließend eine Kupplung mit dem in Dimethylformamid ebenfalls löslichen Bis-Trifluoracetat der Sequenz 11-23 durchzuführen (Syntheseplan 8). Das Tricosapeptid fiel bei der Reaktion als eine dickflüssige, zähe Masse an, konnte aber leicht durch Einrühren in Äthanol als analysenreines amorphes Pulver gewonnen werden.

5. Ausblick

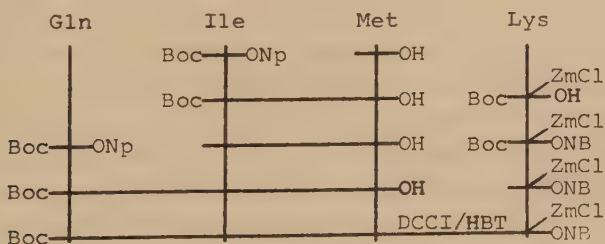
Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen den Schluß zu, nach derselben Strategie die gesamte Partialsequenz 1-27

der Streptococcon-Protease aufbauen zu können. Hierzu muß noch das Tetrapeptid Glu-Ile-Met-Lys als p-Nitrobenzylester mit einem stabilen ϵ -Aminschutz des Lysins dargestellt werden. Erste Versuche dazu sind bereits mit dem N ϵ -m-Chlorbenzyl-oxycarbonyl-Rest am Lysin (173)(175)(176) begonnen worden. Als Alternative wird noch die o-Brom-benzyloxycarbonyl-Gruppe (177) in Erwägung gezogen. Die Schemata zu dieser Sequenz werden abschließend in den Syntheseplänen 12 und 13 dargestellt.

Syntheseplan 12: Sequenz 24-27



Syntheseplan 13: Sequenz 24-27



Eine andere eingangs erwähnte Strategie ist die Fragmentkondensation am festen Träger. Zu dieser weiteren Darstellungsmöglichkeit der gesamten Partialsequenz der Streptococcon-Protease liefern die in dieser Arbeit aufgezeichneten Ergebnisse zur Synthese aktivierter und löslicher Teilpeptide einen grundlegenden Beitrag.

B Experimenteller Teil

1. Material und Methoden

Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf das gereinigte Produkt mit den angegebenen physikalischen Daten.

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät nach Dr. Tottoli (Büchi) bestimmt.

Optische Drehwerte wurden mit dem Polarimeter 141 (Perkin-Elmer) bestimmt.

Die Elementaranalysen wurden in der zentralen Analytik des Fachbereiches Chemie der Universität Marburg durch Herrn Pfeiffer und im Mikroanalytischen Laboratorium Alfred Bernhardt, Elbach ü. Engelskirchen, durchgeführt.

Die Peptidhydrolysen dauerten 20h in 6N HCl bei 110°C im geschlossenen Rohr (178).

Die Aminosäureanalysen wurden am Beckman Unichrom durchgeführt.

Für dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden mit Kieselgel SIF beschichtete Aluminiumfolien der Firma Riedel de Haen, Hannover, benutzt. Als Laufmittel dienten:

- I n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)
- II n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (30:20:6:24)
- III Chloroform/Cyclohexan/Eisessig (45:45:10)
- IV Propanol/Ammoniak/Wasser (6:3:1)
- V Chloroform/Eisessig (9:1)
- VI n-Butanol/Eisessig/Methanol/Pyridin/Methylenchlorid/Wasser (4:1:1:1:2:1)

Wegen der Schwerlöslichkeit vieler Verbindungen in den üblichen Lösungsmitteln wurde häufig zur Chromatographie in Trifluoräthanol gelöst. Wegen seiner guten Lösungseigen-

schaften und seines relativ niedrigen Siedepunktes eignet es sich wesentlich besser als zum Beispiel Dimethylformamid zum Auftragen.

Verbindungen, in denen die Aminogruppe frei oder durch die Tertiärbutyloxycarbonyl-Gruppe geschützt vorlag, wurden durch Besprühen einer 5%igen Lösung von Ninhydrin in Butanol/2N Essigsäure (95:5 v/v) und kurzes Erhitzen im Trockenschrank auf 110°C sichtbar gemacht (179). Außerdem wurde die Chlor-Tolidin-Reaktion angewandt (Besprühen mit 0,05M wässriger Boraxlösung, Einstellen in Chloratmosphäre und anschließend - nach kurzem Erhitzen - mit einer essigsäuren Lösung von o-Tolidin und Kaliumjodid besprühen.) (180)(181). Mit Ninhydrin behandelte Chromatogramme lassen sich ohne Störungen anschließend noch mit Chlor-Tolidin besprühen. Histidin enthaltende Verbindungen wurden außerdem noch mit dem Pauly-Reagenz sichtbar gemacht (182)(183).

L-Aminosäuren wurden in der von den Firmen Merck und Serva gelieferten Reinheit benutzt. Dicyclohexylcarbodiimid und Bromwasserstoff in Eisessig der Firmen Fluka, Merck und Riedel de Haen wurden ungereinigt verwendet. p-Nitrophenol wurde aus 3%iger Salzsäure mit Aktivkohle umkristallisiert. p-Nitrobenzylchlorid wurde aus Äthanol mit Aktivkohle umkristallisiert.

Dimethylformamid wurde durch Destillation nach loc.cit. (184) von Verunreinigungen befreit. Hexamethylphosphorsäuretriamid wurde im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre destilliert. Äther, Tetrahydrofuran und Dioxan wurden nach Vortrocknen über Calciumchlorid bzw. Kaliumhydroxyd über Natrium bis zur Benzen-blauen Reaktion gekocht und anschließend destilliert. Methanol und Äthanol wurde mit Hilfe von Magnesiumspänen (20g/4l) absolutiert. Essigsäure wurde über Phosphorpentoxid destilliert. Triäthylamin wurde nach Vortrocknen mit Kaliumhydroxyd über Phthalsäureanhydrid destilliert.

Alle übrigen Reagenzien und Chemikalien wurden in der von

den Firmen Merck, Fluka, Riedel de Haen, Schuchardt, Bayer, Höchst, Shell, BASF und Degussa gelieferten Qualität verwendet.

Die Peptide Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH, Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-ONp und Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH wurden von Herrn Dr. Schaich übernommen.

2. Verzeichnis der Literaturpräparate

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	Lit.
t-Butyl-oxycarbonyl-azid	Kp ₁₂ 40-50	80	
	Kp ₇₀ 73-76	o.A.	185
t-Butyl-oxycarbonyl-hydrazid	30-40	70	
	41-42	68	185
Chlorameisensäure-benzylester	o.R.	95	
	o.R.	o.A.	186
N-Hydroxybenzotriazol	158-60	80	
	164-66	91	62
N-Hydroxysuccinimid	94-95	64	
	97-98	75	187
p-Methoxybenzylchlorid	Kp ₅ 100-102	52	
	Kp ₅ 100-101	60	188
p-Nitrobenzylalkohol	92-93	66	
	92-93	75	189

(o.R. = ohne Reinigung verwendet; o.A. = ohne Angabe)

Aminosäurederivate

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, LM.	Lit.
Boc-Ala	80-82	86	-25,0		
	80-82	96	-25,2	1, HAc	101
Boc-Ala-ONp	79-80	76	-65,5		
	82	48	-63,5	1,53 MeOH	191
Z-Ala	82-84	75	-13,7	1, HAc	
	84	72	-14,3	1, HAc	89,193
Z-Ala-ONB	98-99	88	-17,8		
	98-99	94,6	-16,8	1, MeOH	29,193
Ala-ONB x HBr	177	65	- 5,5		28
	175-77,5	62	- 5,76	1, MeOH	28,29
Z-Ala-ONp	78	74	-39,8		
	79-79,5	58	-38,1	1,4 EtOAc	207
Ala-ONp x HBr	181-82	96	- 2,3	2 EtOH	
	182-83	97	- 2,4	2,1 EtOH	197,207
Cys-OMe x HCl	138				
	142-43	o.A.	o.A.		144
Cys(S-t-But)	181-83	68			
	o.A.	62	-84,0	1, 1n HCl	137
	179-82	30	-87	1, 0,3n HCl	143
Boc-Cys(S-t-But)	112-14	69	-134,5	1, MeOH	
	118-19	82	-148	1, EtOH	137
	115-16	20	-143	1, MeOH	143
Cys(Thp)	Öl	40	n.b.		
	186-87	o.A.	+11,6	1,1 H ₂ O	144
	184	37	+67,0	1,1 H ₂ O	145
Boc-Cys(Thp)	88	64	-25,6		
	88	54	-17,7	1, EtOH	145
Cys(MBzl)	202-06	80	+23,9		
	198-99	78	+22,6	1, 1n NaOH	157
Boc-Cys(MBzl)	86-89	70	-19,4		
	90-92	68	-22,5	1, EtOH	145
Boc-Gln	117-19	80	- 3,0		
	116-18	82	- 2,9	1, EtOH	101

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, LM.	Lit.
Boc-Gln-ONp	155-56	50	-31,7		
	140-46	31	-31,0	1, EtOAc	160
Boc-Gly	87-90	85			
	94-95	90			101
Boc-Gly-ONp	69-70	76			190
	66-68	74			196,201
Gly-ONp x HCl	178-79	96			
	183,5	79			192
Z-Gly	117-20	75			
	119-20	72			89
Z-Gly-ONp	123-25	82			
	125-27	80			196
Gly-ONp x HBr	212-13	92			
	213-13,5	96			207,197
Z-Gly-ONB	105-06	90			
	107-09	92			198,199
Gly-ONB x HBr	195	83			
	194,5-97	89			199
His-ONB x 2 Tos	213-17	90	+ 6,8		
	217-19	96	+ 6	1, MeOH	200
Boc-His(Boc)-ONB	116-18	64	-12,7		
	112-14	66	-12,5	1, Dioxan	21
Boc-His(Boc)	Öl	70	- 2,5		21
	Öl	65	- 2,7	1, HAC	86,202
Boc-His(Boc)-ONp	142	63	-22,6		
	141-43	60	-22,8	1, Dioxan	21,86
Boc-Ile	68-70	88	- 2,9		
	66-68	96	- 2,5	1, HAC	101
Boc-Ile-ONp	Öl	83	n.b.		
	65-66,5	48	-32,5	2, DMF	203
Lys(Z-mCl)	233-37	45	+10,8		
	236	29	+12,2	1, HAC	173
	245-48	83			175
Boc-Lys(Z-mCl)-	99-100	80	- 6,0		
DCHA	97-99	85	- 6,4	1, HAC	173

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, LM.	Lit.
Boc-Met	44-46	72	n.b.		
	47-49	25	-21,6	0,92 MeOH	101,204
Boc-Met-DCHA	135-36	92	+18,1		
	138-39	95	+19,0	1, MeOH	101
Boc-Met-ONp	98-100	75	-49,5		
	96,5-97,5	45	-50,6	1,2 MeOH	204
Met-ONp x HCl					analog 192
Boc-Thr	75-76	80	- 9,9		
	74-77	88	- 9,5	1, HAC	101
Z-Thr	99-101	75	- 4,8		
	105-06	75-80	- 5,5	4, HAC	30
Boc-Val	73-75	86	- 5,8		
	72-73	93	- 6,0	1, HAC	101
Boc-Val-ONp	Ö1	87	n.b.		
	Ö1	95	o.A.		
	64-66	72	-38,4	1, Dioxan	173
Boc-Val-OSu	122-25	79	-36,3		
	128-29	74	-37,0	2, Dioxan	195
Val-ONp x HCl	184-85	92	- 8,1	1, EtOH	analog 192
Z-Val	58-61	75	- 0,2		
	66-67	80-87	- 0,1	10, EtOH	108
Z-Val-ONp	63-65	71	-24,2		
	63	o.A.	-25,0	2, DMF	205,206
Val-ONp x HBr	204-05	93	-16,8		
	199-200		+17,1	1, H ₂ O	201

(o.A. = ohne Angabe, n.b. = nicht bestimmt)

3. Versuchsanleitungen

3.1. Cysteinderivate

Boc-Cys(S-t-But)-ONp

O,05M (15,5g) Boc-Cys(S-t-But)OH und O,055M (7,7g) p-Nitrophenol werden in 100ml Essigester gelöst und bei -20°C mit O,055M (11,4g) DCCI in 50ml Essigester versetzt. Nach 30 Minuten wird das Kältebad entfernt und der Reaktionsansatz 6 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, erneut gekühlt und der DCH abfiltriert. Das Filtrat wird mit eisgekühlter 1N NaHCO_3 -Lösung und Eiswasser (neutral) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Das Öl wird in Äther aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Die Umkristallisation erfolgt aus Essigester/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 15,7g (73%) Fp.: $115-16^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ läßt sich nicht ermitteln

$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ (430,51)

Ber. C 50,22 H 6,09 N 6,51

Gef. C 50,17 H 5,91 N 6,21

Boc-Cys(S-t-But)-OSu

Die Synthese des N-Succinimidesters erfolgt analog der Vorschrift für Boc-Cys(S-t-But)-ONp.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 18,7g (92%) Fp.: $84-86^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -45,9^{\circ}$ (c=1, DMF)

$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ (406,52)

Ber. C 47,28 H 6,54 N 6,89

Gef. C 47,95 H 6,46 N 7,12

Boc-Cys(Thp)-ONp

Die Synthese erfolgt analog den oben beschriebenen Cysteinderivaten. Der p-Nitrophenylester konnte jedoch nur als Öl

gewonnen werden und wurde als solches weiterverarbeitet.



3.2. Sequenz 16-23

Boc-Thr-Ala-ONB (22)

O,01M (3,1g) Ala-ONB x HBr, O,01M (2,19g) Boc-Thr und O,012M (1,6g) HBT werden in 40ml DMF gelöst, auf -20°C gekühlt, O,01M (1,4ml) TAA zugegeben und unter Rühren mit O,011M (2,3g) DCCI in 10ml DMF versetzt. Nach zehn Minuten läßt man auf Zimmertemperatur ansteigen und rührt noch vier Stunden. Anschließend wird auf 0°C gekühlt, der ausgefallene DCH abfiltriert und das Filtrat in gekühlte ges. NaCl-Lösung gegossen. Das Produkt wird mehrmals mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit gekühlter 1N NaHCO_3 -, 2N KHSO_4 - und ges. NaCl-Lösung gründlich ausgewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert und aus Essigester mit Petroläther kristallisiert und umkristallisiert.

DC: I, III, IV einheitlich

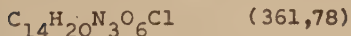
Ausbeute: 3,6g (85%) Fp.: $118-19^{\circ}\text{C}$ Fp_{Lit.}: $119-21^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_D^{24} = -25,6^{\circ}$ (c=1, MeOH) Lit.: $-27,0^{\circ}$ (c=1, MeOH)
 $= -11,5^{\circ}$ (c=1, DMF)



Thr-Ala-ONB x HCl (22)

O,01M (4,25g) Boc-Thr-Ala-ONB werden eine halbe Stunde mit 20ml 4N HCl/Dioxan bei Zimmertemperatur behandelt und anschließend einrotiert. Das schaumige Produkt wird 12 Stunden über $\text{KOH/P}_2\text{O}_5$ getrocknet und weiterverarbeitet.



Z-Ala-Thr-Ala-ONB

O,01M (3,6g) Thr-Ala-ONB x HCl, O,01M (3,5g) Z-Ala-ONp und O,012M (1,6g) HBT werden in 100ml DMF gelöst, auf -20°C ge-

kühlt, mit 0,01M (1,4ml) TAA versetzt und nach zehn Minuten langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und noch 12 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wird in eisgekühlte ges. NaCl-Lösung gegossen, das ausfallende Produkt abfiltriert und mit Wasser gründlich gewaschen. Die Umkristallisation erfolgt aus Äthanol/Wasser und nach Trocknen über CaCl_2 aus abs. Äthanol/Petroläther.

DC: I, II, III einheitlich

Ausbeute: 4,6g (87%) Fp.: 179-180°C

$[\alpha]_D^{24} = -10,3^\circ$ (c=1, DMF)

$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_9$ (530,53)

Ber. C 56,60 H 5,70 N 10,56

Gef. C 56,75 H 5,80 N 10,15

Ala-Thr-Ala-OH x H₂O

0,01M (5,3g) Z-Ala-Thr-Ala-ONB werden in 100ml Methanol gelöst, mit 1ml Eisessig versetzt und über Pd/Aktivkohle hydriert. Nach Beendigung der H₂-Aufnahme wird die Lösung filtriert, das Filtrat auf das halbe Volumen eingeeengt und das Produkt mit Äther ausgefällt. Die Umkristallisation wird aus Methanol mit Äther vorgenommen.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 2,6g (93%) Fp.: 174-76°C

$[\alpha]_D^{24} = -45,5^\circ$ (c=1, H₂O)

$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6$ (279,29)

Ber. C 43,00 H 7,57 N 15,04

Gef. C 42,72 H 7,26 N 14,61

Boc-Ala-Thr-Ala-ONB (22)

0,01M (3,6g) Thr-Ala-ONB x HCL werden in 20ml DMF gelöst und mit 0,01M (1,9g) Boc-Ala und 0,012M (1,6g) HBT in 20ml DMF

zusammengegossen. Man kühlt anschließend auf -20°C , gibt 0,01M (1,4ml) TAA zu, läßt 0,011M (2,3g) DCCI in 10ml DMF zulaufen; nach zehn Minuten wird die Reaktionslösung noch vier Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Dann filtriert man den ausgefallenen DCH der auf 0°C gekühlten Lösung ab, gießt das Filtrat in eisgekühlte ges. NaCl-Lösung und extrahiert das sich abscheidende Öl mehrmals mit Essigester. Die vereinigten Extrakte werden mit gekühlter 1N NaHCO_3 -, 2N KHSO_4 - und ges. NaCl-Lösung gründlich gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Das Produkt wird aus Äthanol mit Wasser kristallisiert und mit abs. Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

DC: I, IV, III einheitlich

Ausbeute: 4,3g (87%) Fp.: $86-87^{\circ}\text{C}$ Fp_{Lit.}: $86-88^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_D^{24} = -41,5^{\circ}$ (c=1, MeOH) Lit.: $-41,7^{\circ}$ (c=1, MeOH)
 $= -20,6^{\circ}$ (c=1, DMF)

$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_9$ (496,52)

Ala-Thr-Ala-ONB x HCl (22)

0,01M (5,0g) Boc-Ala-Thr-Ala-ONB werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 50ml 4N HCl/Dioxan behandelt. Das Produkt beginnt nach wenigen Minuten auszukristallisieren. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird die Suspension einrotiert und der Rückstand aus Methanol/Äther umkristallisiert.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 4,2g (96%) Fp.: $136-38^{\circ}\text{C}$ Fp_{Lit.}: $134-36^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_D^{24} = -29,8^{\circ}$ (c=1, MeOH) Lit.: $-29,2^{\circ}$ (c=1, MeOH)
 $= -11,1^{\circ}$ (c=1, DMF)

$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_7\text{Cl}$ (432,86)

Boc-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

0,01M (4,3g) Ala-Thr-Ala-ONB x HCl, 0,01M (2,2g) Boc-Thr und 0,012M (1,6g) HBT werden in 60ml DMF gelöst, auf -20°C gekühlt, 0,01M (1,4ml) TAA zugegeben und mit 0,011M (2,3g) DCCI in 20ml DMF versetzt. Nach zehn Minuten läßt man auf

Zimmertemperatur ansteigen und rührt noch weitere 12 Stunden. Die Lösung wird wieder auf 0°C gekühlt, der ausgefallene DCH abfiltriert und das Filtrat in eisgekühlte ges. NaCl-Lösung gegossen, wobei das Tetrapeptid ausfällt. Es wird abgesaugt, neutral gewaschen, aus Äthanol/Wasser gefällt und nach sorgfältigem Trocknen aus Äthanol/Petroläther umgefällt. Das gallertige Produkt wird über P₂O₅ getrocknet.

DC: I, III, IV einheitlich

Ausbeute: 5,0g (84%) Fp.: 124-25°C

[α]_D²⁴ = -14,5° (c=1, DMF)

C₂₆H₃₉N₅O₁₁ (597,62)

Ber. C 52,25 H 6,58 N 11,72

Gef. C 52,02 H 6,52 N 11,55

Aminosäureanalyse:

	Ala	Thr
Ber.	2,0	2,0
Gef.	2,00	2,06

Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA

0,01M (6,0g) Boc-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB werden eine halbe Stunde mit 40ml TFA bei Zimmertemperatur behandelt und einrotiert. Das Öl wird mit Äther aufgenommen und verrieben bis alles Produkt fest ist und zweimal mit Äther gründlich aufgeschlämmt und gewaschen. Das Trifluoracetat, das sich nicht aus Äthanol/Äther/Petroläther umkristallisieren läßt, wird über P₂O₅ getrocknet.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 5,9g (98%) Fp.: 164-66°C (Z)

[α]_D²⁴ = -8,8° (c=1, DMF)

C₂₃H₃₂N₅O₁₁F₃ (611,53)

Ber. C 45,17 H 5,27 N 11,45

Gef. C 45,88 H 5,23 N 11,64

Z-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

0,01M (6,1g) Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA, 0,01M (3,5g) Z-Ala-ONp und 0,012M (1,6g) HBT werden in 150ml DMF gelöst und unter Kühlung mit 0,01M (1,4ml) TAA versetzt. Nach zehn

Minuten wird das Kältebad entfernt und der Reaktionsansatz drei Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Die nun gallertige Lösung wird in 1 l Eiswasser gegossen, noch zwei Stunden gerührt, abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und der Filterkuchen aus heißem Äthanol unter Zugabe von Äther umgefällt.

DC: I, III, IV einheitlich

Ausbeute: 5,8g (83%) Fp.: 226°C

$[\alpha]_D^{24} = -10,6^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{32}H_{42}N_6O_{12}$ (702,72)

Ber. C 54,69 H 6,02 N 11,95

Gef. C 54,17 H 5,96 N 11,74

Aminosäureanalyse:

	Ala	Thr
Ber.	3,0	2,0
Gef.	3,00	1,89

Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH x H₂O

0,01M (7,0g) Z-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB werden in 200ml heißem Äthanol gelöst und mit Pd/Aktivkohle hydriert bis kein H₂ mehr aufgenommen wird. Es werden nochmals 400ml Wasser und Katalysator hinzugefügt und weiter hydriert bis die berechnete Menge H₂ aufgebraucht ist. Ungelöstes freies Pentapeptid wird mit reichlich Wasser gelöst und filtriert. Das Filtrat wird bis auf ein kleines Volumen einrotiert, mit Äther ausgewaschen und durch Zugabe von Äthanol und Äther wird das Pentapeptid gefällt. Die Kristallisation erfolgt aus wenig Wasser, mit reichlich Äthanol und Äther wird nachgefällt.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 4,1g (95%) Fp.: 227-28°C

$[\alpha]_D^{24} = -82,1^\circ$ (c=1, H₂O)

$C_{17}H_{31}N_5O_8$ (433,46)

Ber. C 45,23 H 7,37 N 15,51

Gef. C 45,12 H 7,12 N 15,27,

Aminosäureanalyse:

	Ala	Thr
Ber.	3,0	2,0
Gef.	3,00	1,95

Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

0,05M (30,5g) Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA, 0,05M (9,5g) Boc-Ala und 0,055M (7,5g) HBT werden in 400ml DMF gelöst, auf -20°C gekühlt und mit 0,05M (7,0ml) TAA versetzt. Nach fünf Minuten werden 0,055M (11,5g) DCCI in 100ml DMF langsam zuge-
tropft, nach weiteren zehn Minuten wird das Kältebad entfernt und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Nach kurzem Küh-
len auf 0°C wird der ausgefallene DCH abfiltriert und die Lösung in eisgekühlte, ges. NaCl-Lösung gegossen. Das Pro-
dukt ist nach drei Stunden ausgefallen, wird abgenutscht und gründlich mit Wasser nachgewaschen. Der noch feuchte Filter-
kuchen wird in Äthanol unter Erwärmen gelöst und mit Wasser erneut gefüllt. Nach dem Absaugen wird scharf getrocknet,
aus abs. Äthanol/Petroläther umgefüllt und wie üblich ge-
trocknet.

DC: I, III, IV einheitlich

Ausbeute: 29,0g (95%) Fp.: $211-12^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -18,8^{\circ}$ (c=1, DMF)

$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (668,70)

Ber. C 52,08 H 6,63 N 12,56

Gef. C 51,43 H 6,56 N 12,51

Aminosäureanalyse:

	Ala	Thr
Ber.	3,0	2,0
Gef.	3,00	1,92

Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA

Eine halbe Stunde werden 0,01M (6,7g) Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB mit 100ml TFA bei Zimmertemperatur behandelt und
einrotiert. Der feste Rückstand wird mit Äther zweimal
gründlich aufgeschlämmt und gewaschen. Die Umfällung erfolgt
aus abs. Äthanol/abs. Äther. Die amorphe Substanz wird über
 P_2O_5 getrocknet.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 6,2g (98%) Fp.: $183-86^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -4,6^{\circ}$ (c=1, DMF)

$C_{26}H_{37}N_6O_{12}F_3$ (682,60)

Ber. C 45,74 H 5,46 N 12,31

Gef. C 45,63 H 5,30 N 12,33

Z-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

0,01M (3,7g) Z-Val-ONp, 0,012M (1,6g) HBT und 0,01M (6,8g) Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA werden in 150ml DMF gelöst und bei $-20^{\circ}C$ mit 0,01M (1,4ml) TAA versetzt. Nach zehn Minuten wird die Reaktionslösung aus dem Kältebad entfernt und noch 24 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt fällt als Gallerte an und wird durch Zugabe der doppelten Menge Äthanol vollständig ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Produkt je zweimal in 1N $NaHCO_3$ und Wasser aufgeschlämmt und abzentrifugiert. Anschließend wird das Hexapeptid in heißem DMF gelöst, gekühlt, mit Äthanol nachgefällt, abgesaugt und mit Äther nachgewaschen.

DC: I, III, IV einheitlich

Ausbeute: 6,4g (80%) Fp.: $250^{\circ}C$

$[\alpha]_D^{24} = -2,5^{\circ}$ (c=0,2, DMF)

$= -9,8^{\circ}$ (c=1, HMPT)

$C_{37}H_{51}N_7O_{13}$ (801,86)

Ber. C 55,42 H 6,41 N 12,22

Gef. C 55,24 H 6,38 N 12,14

Aminosäureanalyse:

	Ala	Thr	Val
Ber.	3,0	2,0	1,0
Gef.	3,00	1,90	0,98

Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH

0,01M (8,0g) Z-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB werden in 300ml heißem DMF gelöst und mit Pd/Aktivkohle hydriert bis kein H_2 mehr aufgenommen wird. Nach der Zugabe von 600ml Wasser und weiterem Katalysator wird nachhydriert bis die berechnete Menge H_2 aufgenommen ist. Die Reaktionslösung wird weiter mit Wasser verdünnt bis alles Produkt in Lösung gegangen ist, abfiltriert, bis auf ein kleines Volumen einrotiert und

mit reichlich Äthanol versetzt. Das ausgefallene freie Hexapeptid wird abgesaugt, in Äthanol aufgeköcht, mit Äther versetzt, filtriert und das ausgefallene Produkt gewaschen und getrocknet.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 5,0g (94%) Fp.: 251°C

$[\alpha]_D^{24} = -18,4^\circ$ (c=0,2, H₂O)

C₂₂H₄₀N₆O₉ (532,59)

Ber. C 49,61 H 7,57 N 15,77

Gef. C 49,80 H 7,43 N 15,66

Aminosäureanalyse:

	Ala	Thr	Val
Ber.	3,0	2,0	1,0
Gef.	3,00	1,94	1,01

Boc-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH

0,01M (5,3g) Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala, 0,01M (4,3g) Boc-Cys-(S-t-But)-ONp (-OSu) und 0,012M (1,6g) HBT werden in 300ml DMF aufgeschlämmt, unter Kühlung mit 1,4ml TAA versetzt und drei Tage bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die gallertige Lösung wird in 3l Eiswasser eingerührt, mit KHSO₄ vorsichtig auf pH 4 angesäuert, drei Stunden stehen gelassen und das ausgefallene Produkt abgesaugt. Der Filterkuchen wird zweimal in Äthanol aufgeköcht, abzentrifugiert und in Äther aufgeschlämmt und gründlich gewaschen. Das Peptid ist nur bedingt in siedendem DMF löslich und läßt sich nicht durch Auskochen mit Wasser von dem eingesetzten Hexapeptid befreien.

DC: I, II, IV nicht einheitlich (verunreinigt durch Hexapeptid)

Ausbeute: 4,8g (60%)

C₃₄H₆₁N₇O₁₂S₂ (824,03)

Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH x TFA

0,01M (8,2g) Boc-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala werden in 200ml TFA bei Zimmertemperatur eine halbe Stunde behandelt, einrotiert und mit abs. Äther bis zur Trockene ver-

rieben und gründlich gewaschen. Das Trifluoracetat läßt sich nicht aus Äthanol/Äther/Petroläther kristallisieren.

DC: I, II, IV nicht einheitlich (verunreinigt durch Hexapeptid)

Ausbeute: 8,2g (98%)

$C_{31}H_{54}N_7O_{12}S_2F_3$ (837,93)

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH

5mM (4,1g) Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH x TFA werden mit zwei Äquivalenten $NaHCO_3$ in 100ml Wasser aufgeschlämmt und unter Eiskühlung mit 5mM (2,4g) Boc-His(Boc)-ONp in 200ml DMF versetzt. Der Ansatz wird drei Tage bei Zimmertemperatur geschüttelt, nochmals mit 5mM Boc-His(Boc)-ONp in 200ml DMF versetzt und weitere vier Tage geschüttelt. Die nun fast klare Lösung wird filtriert und das Filtrat in ca. 2l Eiswasser eingerührt, mit 2N $KHSO_4$ -Lösung auf pH 4 angesäuert und abzentrifugiert. Das gallertige, nur in siedendem DMF lösliche Oktapeptid wird mit Wasser gründlich aufgeschlämmt und nach jeweiligem Abzentrifugieren mit Äthanol, Wasser, Äthanol und zuletzt Essigester ausgekocht.

DC: I, IV, VI einheitlich

Ausbeute: 1,9g (36,5%)

Fp.: 206°C

$[\alpha]_D^{24} = -27,2^\circ$ (c=1, HMPT)

$C_{45}H_{76}N_{10}O_{15}S_2$ (1061,28)

Aminosäureanalyse:

	His	Val	Ala	Thr	Cys
Ber.	1,0	1,0	3,0	2,0	1,0
Gef.	1,08	0,99	3,00	1,93	n.b.

Eine Umfällung aus siedendem DMF und Nachbehandlung mit Äther ist möglich. Das Chromatogramm zeigt daraufhin eine zusätzliche gleich intensive Pauly-, Ninhydrin- und Chlor/Tolidin-positive Bande bei gleichbleibender Aminosäureanalyse, was auf eine teilweise Abspaltung des N-Imidazol-Schutzes zurückzuführen ist. Es kann daher keine C,H,N-Analyse angegeben werden.

Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

0,01M (6,8g) Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA, 0,011M (1,6g) Boc-Val und 0,011M (1,5g) HBT werden in 180ml DMF gelöst. Bei -20°C werden 0,01M (1,4ml) TAA und 0,011M (2,2g) DCCI in 20ml DMF zugefügt. Nach zehn Minuten wird die Reaktionslösung aus dem Kältebad entfernt und noch 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der Ansatz kurz gekühlt, der ausgefallene DCH abfiltriert und das Filtrat in ca. 1 l Eiswasser eingegossen. Der ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt und der noch feuchte Filterkuchen in siedendem Äthanol gelöst. Nach dem Erkalten wird erneut abgesaugt und aus Äthanol umkristallisiert.

DC: I, VI, IV einheitlich

Ausbeute: 4,9g (58,3%) Fp.: 235°C

$[\alpha]_D^{24} = -18,4^\circ$ (c=1, DMF)

Die Synthese von Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB aus Boc-Val-ONp und Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA verläuft analog.

Ausbeute: 4,5g (53,8%) Fp.: 233°C

$[\alpha]_D^{24} = -18,7^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{40}H_{49}N_7O_{13}$ (835,87)

Ber. C 53,19 H 6,96 N 12,77

Gef. C 52,69 H 6,69 N 12,74

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ala	Val
Ber.	2,0	3,0	1,0
Gef.	1,97	3,00	1,04

Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA

0,005M (4,2g) Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB werden eine halbe Stunde bei Raumtemperatur mit 50ml TFA behandelt, einrotiert und das verbleibende Öl wird mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben. Nach erneutem Aufschlännen in abs. Äther wird das Produkt aus abs. Methanol mit abs. Äther gefällt.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 4,0g (94%)

Fp.: 169-71°C

$[\alpha]_D^{24} = +1,1^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{37}H_{42}N_7O_{13}F_3$ (849,77)

Ber. C 47,63 H 5,93 N 12,54

Gef. C 47,25 H 5,69 N 12,08

Boc-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

O,005M (4,25g) Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA, O,006M (2,6g) Boc-Cys(S-t-But)-ONp und O,006M (0,8g) HBT werden in 100ml DMF gelöst, bei $0^\circ C$ mit O,005M (0,7ml) TAA versetzt und bei Zimmertemperatur 48 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wird filtriert und in 800ml Eiswasser eingerührt. Der ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt und der noch feuchte Filterkuchen in siedendem Äthanol gelöst. Nach dem Erkalten wird erneut abgesaugt und aus Äthanol umkristallisiert.

DC: I, IV, VI einheitlich

Ausbeute: 4,4g (92%)

Fp.: $231^\circ C$ (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -55,1^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{41}H_{66}N_8O_{14}S_2$ (959,15)

Ber. C 51,34 H 6,94 N 11,68

Gef. C 51,09 H 7,08 N 11,61

Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA

O,005M (4,3g) Boc-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB werden eine halbe Stunde bei Raumtemperatur mit 50ml TFA behandelt, einrotiert und mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben. Die rohe Kristallmasse wird nochmals in abs. Äther gründlich aufgeschlämmt und aus Methanol mit Äther gefällt.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 4,6g (95%)

Fp.: $202-3^\circ C$

$[\alpha]_D^{24} = +4,7^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{38}H_{59}N_8O_{14}S_2F_3$ (973,05)

Ber. C 46,91 H 6,11 N 11,52

Gef. C 46,64 H 5,89 N 11,28

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

2mM (1,9g) Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA werden in 50ml DMF gelöst. In die klare Lösung gibt man 3mM (1,4g) Boc-His(Boc)-ONp und 3mM (0,4g) HBT und versetzt bei 0°C mit 2mM (0,3ml) TAA. Nach zehn Minuten wird das Kältebad entfernt und der Reaktionsansatz 48 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Die nun trübe Lösung wird in 500ml Eiswasser eingerührt und der Niederschlag nach einer Stunde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird zweimal aus Äthanol umkristallisiert und mit Äther und Petroläther gewaschen.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 1,9g (79%)

Fp.: 222°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -32,8^\circ$ (c=1, HMPT)

Weitere Daten S.85

3.3. Synthese der Sequenz 16-18 (His-Cys-Val)

Boc-Cys(S-t-But)-Val-OH

0,01M (4,1g) Boc-Cys(S-t-But)-OSu werden in 100ml DMF gelöst und mit 0,01M (1,2g) Val in 100ml Wasser, in dem 0,01M (0,7g) NaHCO_3 gelöst sind, bei 5°C versetzt. Man läßt 24 Stunden bei Zimmertemperatur rühren, filtriert vom Rückstand ab, verdünnt mit ca. 600ml Eiswasser und wäscht mit Äther. Die wässrige Phase wird vorsichtig unter Eiskühlung mit gesättigter KHSO_4 -Lösung auf pH 2-3 angesäuert, das Produkt mit Essigester aufgenommen und die Essigesterphase mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, einrotiert, erneut in wenig Essigester aufgenommen und mit Petroläther vorsichtig gefällt. Die Fällung dauert zwei bis drei Tage bei dauernder Kühlung.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 1,8g (44%)

Fp.: 108-10°C

$[\alpha]_D^{24} = -95,6^\circ$ (c=1, DMF)

$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ (408,54)

Ber. C 49,97 H 7,89 N 6,85

Gef. C 50,49 H 8,10 N 7,14

Cys(S-t-But)-Val-OH x HCl

O,01M (4,1g) Boc-Cys(S-t-But)-Val werden mit 50ml 4N HCl/Dioxan eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird einrotiert und das Produkt mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben und noch zweimal mit abs. Äther gründlich aufgeschlämmt und gewaschen. Es wird aus abs. Methanol/Äther umkristallisiert.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 3,4g (98%)

Fp.: 136-37°C

C₁₂H₂₅N₂O₃S₂Cl (344,92)

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-But)-Val-OH

O,01M (3,4g) Cys(S-t-But)-Val x HCl, O,01M (1,35g) HBT und O,01M (4,8g) Boc-His(Boc)-ONp werden in 100ml DMF gelöst und bei 0°C werden O,01M (1,4ml) TAA zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 24 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, vom Rückstand abfiltriert und das Filtrat in 1,5 l ges. NaCl-Lösung gegossen. Das Produkt wird durch dreifache Extraktion in Essigester aufgenommen; die Extrakte werden mit 1N KHSO₄ gewaschen, mit ges. NaCl-Lösung neutralgewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, einrotiert, in wenig Essigester aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Die Umkristallisation wird ebenfalls aus Essigester/Petroläther vorgenommen.

DC: I, III, IV einheitlich

Ausbeute: 4,5g (70%)

Fp.: 114-16°C

[α]_D²⁴ = -51,2° (c=1, DMF)

C₂₈H₄₇N₅O₈S₂ (645,84)

Ber. C 52,07 H 7,33 N 10,84

Gef. C 52,14 H 7,30 N 10,79

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-But)-Val-ONp

5mM (3,0g) Boc-His(Boc)-Cys(S-t-But)-Val-OH und 5mM (0,7g) p-Nitrophenol werden mit 5mM (1,4g) HBT in 100ml DMF gelöst

und bei 0°C mit 6mM (1,2g) DCCI in 20ml DMF versetzt. Nach zehn Minuten wird die Reaktionslösung aus dem Kältebad entfernt und 36 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, der gebildete DCH abfiltriert und das Filtrat in eiskalte ges. NaCl-Lösung gegossen. Das Produkt wird mit Essigester ausgewaschen, und die vereinigten Essigesterlösungen werden mit eiskalter 1N NaHCO₃-Lösung, Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, einrotiert und aus wenig Tetrachlorkohlenstoff mit reichlich Petroläther gefällt. Die Umkristallisation erfolgt aus abs. Äther/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 1,8g (47%)

Fp.: 85-89°C

$[\alpha]_D^{24} = -59,2^\circ$ (c=1, DMF)

Analyse: S.

Boc-Cys(S-t-But)-Val-ONp

O,01M (3,1g) Boc-Cys(S-t-But) und O,01M (3,2g) Val-ONp x HBr werden in 100ml Chloroform aufgeschlämmt und bei 0°C mit O,01M (1,4ml) NMM und O,011M (2,3g) DCCI versetzt. Nach zehn Minuten wird die Reaktionslösung noch 12 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, gekühlt, vom Rückstand abfiltriert, einrotiert, mit Essigester aufgenommen und erneut vom ausgefallenen DCH abfiltriert. Das Produkt wird aus wenig Essigester mit Petroläther gefällt.

DC: I, III, V einheitlich

Ausbeute: 4,7g (79%)

Fp.: 97-98°C

$[\alpha]_D^{24} = -76,3^\circ$ (c=1, DMF)

C₂₃H₃₅N₃O₇S₂ (529,67)

Ber. C 52,15 H 6,66 N 7,93

Gef. C 52,57 H 7,08 N 7,84

Cys(S-t-But)-Val-ONp x HCl

O,01M (5,3g) Boc-Cys(S-t-But)-Val-ONp werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 100ml 4N HCl/Dioxan behandelt, einrotiert und mit abs. Äther verrieben, bis das Produkt fest ist. Die stark hygroskopische Substanz wird noch

zweimal mit abs. Äther sorgfältig aufgeschlämmt und gründlich gewaschen.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 4,1g (87%)

Fp.: 145-47°C

$[\alpha]_D^{24} = +21,9^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{18}H_{28}N_3O_5S_2Cl$ (466,02)

Ber. C 46,39 H 6,06 N 9,02

Gef. C 45,97 H 5,80 N 9,18

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-But)-Val-ONp

0,01M (5,3g) Cys(S-t-But)-Val-ONp x HCl und 0,01M Boc-His (Boc) (22) werden in 100ml Chloroform aufgeschlämmt und bei 0°C mit 0,01M (1,4ml) NMM und 0,011M (2,3g) DCCI in 20ml Chloroform versetzt. Nach fünf Minuten läßt man auf Zimmertemperatur ansteigen, läßt über Nacht rühren, kühlt, filtriert vom DCH ab, rotiert ein und nimmt das Produkt in Essigester wieder auf. Nach abermals guter Kühlung wird vom letzten DCH abfiltriert, zweimal mit 1N NaHCO₃- und mit ges. NaCl-Lösung neutral gewaschen, die Lösung einrotiert und in Äther aufgenommen. Die Fällung erfolgt mit Petroläther, die Umkristallisation ebenfalls aus Äther/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 6,6g (87%)

Fp.: 88-90°C

$[\alpha]_D^{24} = -62,6^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{34}H_{50}N_6O_{10}S_2$ (766,93)

Ber. C 53,25 N 6,57 N 10,96

Gef. C 53,39 H 6,72 N 10,68

Boc-Cys(Thp)-Val-OH

0,01M (4,3g) Boc-Cys(Thp)-ONp (Öl) werden in 100ml DMF gelöst. Dazu tropft man bei 0°C langsam eine Lösung von 0,01M (1,2g) Val und 0,7g NaHCO₃ in 100ml Wasser. Sind die Lösungen vereint, wird der Ansatz noch 48 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird in ca. 600ml Eiswasser gegossen, mit Äther dreimal gewaschen und vorsichtig unter Eiskühlung mit gesättigter KHSO₄-Lösung auf pH 3

angesäuert. Das sich abscheidende Öl wird durch dreifache Extraktion in Essigester aufgenommen, mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und aus Essigester mit Petroläther erneut ausgeschieden. Das Öl wird über P_2O_5 getrocknet.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 2,6g (64%)

$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ (404,53)

Cys(Thp)-Val-OH x HCl

0,01M (4,0g) Boc-Cys(Thp)-Val-OH werden mit 40ml 3N HCl/Dioxan eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur behandelt. Die Reaktionslösung wird einrotiert, mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben, zweimal mit abs. Äther gründlich aufgeschlümmt und aus abs. THF/Äther und abs. Äthanol/Äther umgefällt und über P_2O_5 getrocknet.

DC: trotz wiederholter Umkristallisation nicht einheitlich

Ausbeute: 1,5g (44%)

$[\alpha]_D^{24} = +3,9^\circ$ (c=1, DMF)

$\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4\text{S Cl}$ (340,87)

Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-OH

0,02M (6,8g) Cys(Thp)-Val-OH x HCl werden in 100ml DMF gelöst und bei 0°C mit 0,04M (5,6ml) TAA und 0,02M (9,5g) Boc-His(Boc)-ONp in 100ml DMF versetzt. Nach 24 Stunden Reaktionsdauer wird der Ansatz in 1,2 l eisgekühlte ges. NaCl-Lösung gegossen und das ausfallende Produkt in Essigester durch Extraktion aufgenommen. Die vereinigten Essigesterextrakte werden mit 1N KHSO_4 und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert und aus Äther/Petroläther gefällt. Die Umkristallisation erfolgt aus Tetrachlorkohlenstoff/Petroläther.

DC: I, III, IV einheitlich

Ausbeute: 4,3g (66%)

Fp.: $120-22^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{24} = -20,9^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{29}H_{47}N_5O_9S$ (641,78)

Ber. C 54,27 H 7,38 N 10,91

Gef. C 54,56 H 7,36 N 10,81

Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-ONp

0,01M (6,4g) Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-OH und 0,015M (2,1g) p-Nitrophenol werden in 100ml abs. Essigester gelöst und bei $-20^{\circ}C$ mit 0,011M (2,2g) DCCI in 20ml abs. Essigester versetzt. Nach zehn Minuten läßt man auf Zimmertemperatur ansteigen und rührt noch sechs Stunden. Dann wird der gebildete DCH abfiltriert und die Reaktionslösung dreimal mit kalter 1N $NaHCO_3$ - und einmal mit kalter 2N $KHSO_4$ -Lösung gewaschen. Die weitere Reinigung erfolgt durch Waschen mit ges. NaCl-Lösung. Es wird über Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert, in Äther aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Um ein analysenreines Produkt zu erhalten, muß unter hohem Substanzverlust mehrfach umgefällt werden.

Ausbeute: 1,1g (14,4%)

$[\alpha]_D^{24} = -37,2^{\circ}$ (c=1, DMF)

weitere Daten s.S. 74,75

Boc-Cys(Thp)-Val-ONp

0,01M (3,0g) Boc-Cys(Thp)-OH und 0,01M (3,2g) Val-ONp x HBr werden in 100ml Chloroform aufgeschlämmt und bei $-20^{\circ}C$ mit 0,011M (2,3g) DCCI in 20ml Chloroform und 0,01M (1,4ml) NMM versetzt. Nach zehn Minuten entfernt man das Kühlbad und rührt über Nacht. Nach kurzem Kühlen wird der ausgefallene DCH abfiltriert, die Lösung einrotiert, in Essigester aufgenommen und erneut filtriert. Die klare Lösung wird mit eisgekühlter 1N $NaHCO_3$ -Lösung, Eiswasser und ges. NaCl-Lösung je zweimal gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petroläther.

DC: I, II, III einheitlich

Ausbeute: 4,2g (80%)

Fp.: $132-134^{\circ}C$

$[\alpha]_D^{24} = +6,6^{\circ}$ (c=1, DMF)

$C_{24}H_{35}N_3O_8S$ (525,62)

Ber. C 54,84 H 6,71 N 7,99

Gef. C 54,86 H 6,42 N 7,96

Cys(Thp)-Val-ONp x HCl

0,01M (5,3g) Boc-Cys(Thp)-Val-ONp werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 3N HCl/Dioxan behandelt. Nach dem Einrotieren wird das Öl mit abs. Äther zur Trockene verrieben, und mit abs. Äther nochmals aufgeschlämmt. Die stark hygroskopische Substanz wird aus abs. Äthanol mit abs. Äther gefällt.

DC: I, II, III, einheitlich

Ausbeute: 4,2g (91%)

Fp.: 98-100°C

$[\alpha]_D^{24} = -7,6^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{19}H_{28}N_3O_6S$ Cl (461,96)

Ber. C 49,40 H 6,11 N 9,10

Gef. C 49,54 H 5,85 N 9,30

Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-ONp

0,01M (4,6g) Cys(Thp)-Val-ONp x HCl und 0,012M Boc-His(Boc) (22) werden in 100ml DMF gelöst, auf -20°C gekühlt und mit 0,01M (1,4ml) NMM und 0,011M (2,2g) DCCI versetzt. Man entfernt das Kältebad nach zehn Minuten und rührt die Reaktionslösung acht Stunden bei Zimmertemperatur. Nach dem Abfiltrieren des ausgefallenen DCHs wird die Lösung einrotiert, in Essigester aufgenommen, erneut vom DCH abgetrennt und die klare Lösung mit eisgekühlter 1N $NaHCO_3$ -Lösung und mit Eiswasser je dreimal gewaschen. Die über Na_2SO_4 getrocknete Lösung wird einrotiert, das Öl in abs. Äther aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Die Umkristallisation erfolgt aus Äther/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 4,4g (57,7%)

Fp.: 79-81°C

$[\alpha]_D^{24} = -37,1^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{35}H_{50}N_6O_{11}S$ (762,88)

Ber. C 55,10 H 6,61 N 11,02

Gef. C 54,40 H 6,37 N 11,16

Boc-Cys(MBzl)-Val-ONp

0,01M (3,4g) Boc-Cys(MBzl) und 0,01M (3,2g) Val-ONp x HBr werden in 100ml Chloroform aufgeschlämmt und bei 0°C mit 0,01M (1,4ml) NMM und 0,011M (2,3g) DCCI versetzt. Nach zehn Minuten wird die Reaktionslösung noch 12 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, gekühlt, vom Rückstand abfiltriert, einrotiert, mit Essigester aufgenommen und erneut vom ausgefallenen DCH abfiltriert. Das Produkt wird aus wenig Essigester mit Petroläther gefällt.

DC: I, III, V einheitlich

Ausbeute: 4,1g (73%)

Fp.: 130-31°C

$[\alpha]_D^{24} = -32,8^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{27}H_{35}N_3O_8S$ (561,65)

Ber. C 57,73 H 6,28 N 7,48

Gef. C 58,18 H 6,41 N 7,54

Cys(MBzl)-Val-ONp x HCl

0,01M (5,6g) Boc-Cys(MBzl)-Val-ONp werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 100ml 4N HCl/Dioxan behandelt, einrotiert und mit abs. Äther verrieben bis das Produkt fest ist. Nach gründlichem Auswaschen mit abs. Äther wird das Produkt vorsichtig aus abs. Methanol mit abs. Äther gefällt. Die Kristallisation dauert über 24 Stunden.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 3,8g (75%)

Fp.: 137-39°C

$C_{22}H_{28}N_3O_6S Cl$ (498,00)

Ber. C 53,06 H 5,67 N 8,44

Gef. C 53,05 H 5,51 N 8,63

Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-ONp

0,01M (5,0g) Cys(MBzl)-Val-ONp x HCl und 0,01M Boc-His(Boc) (22) werden in 100ml Chloroform gelöst und bei 0°C mit 0,01M (1,4ml) NMM und 0,011M (2,3g) DCCI in 20ml Chloroform versetzt. Nach fünf Minuten läßt man auf Zimmertemperatur ansteigen, läßt über Nacht rühren, kühlt, filtriert vom DCH ab, rotiert ein und nimmt das Produkt wieder in Essigester auf. Nach abermals guter Kühlung wird vom letzten DCH abfiltriert, die Lösung einrotiert und in Äther aufgenommen. Die Fällung erfolgt mit Petroläther, die Umkristallisation ebenfalls aus Äther/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 6,0g (75%)

Fp.: 126-27°C

$[\alpha]_D^{24} = -33,6^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{38}H_{50}N_6O_{11}S$ (798,91)

Ber. C 57,13 H 6,31 N 10,52

Gef. C 56,98 H 6,28 N 10,28

3.4. Sequenz 12-15 (Ala-Ala-Thr-Gly)

Boc-Thr-Gly-ONp

0,02M (4,4g) Boc-Thr und 0,02M (5,6g) Gly-ONp x HBr (HCl) werden in 80ml Chloroform aufgeschlämmt, auf -20°C gekühlt, mit 0,02M (2,8ml) NMM und mit 0,021M (4,3g) DCCI in 20ml Chloroform versetzt. Man läßt nach zehn Minuten auf Zimmertemperatur ansteigen und läßt weitere 12 Stunden rühren. Nach erneuter Abkühlung wird der ausgefallene DCH abfiltriert. Das Filtrat wird mit Eiswasser, kalter 5%iger $NaHCO_3$ - und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Das Produkt wird in wenig Essigester aufgenommen und vorsichtig bis zur schwachen Trübung mit Petroläther versetzt. Die Kristallisation wird mit weiteren Gaben Petroläther vervollständigt und dauert mehrere Tage. Die Umkristallisation erfolgt aus Essigester/Petroläther.

DC: I, II, III einheitlich

Ausbeute: 6,9g (87%)

Fp.: 90-95°C

$[\alpha]_D^{24} = -7,4^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{17}H_{23}N_3O_8$ (397,38)

Ber. C 51,38 H 5,83 N 10,57

Gef. C 51,26 H 5,86 N 10,70

Thr-Gly-ONp x HCl

0,01M (4,0g) Boc-Thr-Gly-ONp werden eine halbe Stunde mit 20ml 4N HCl/Dioxan bei Zimmertemperatur behandelt, einrotiert, mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben und nochmals mit abs. Äther aufgeschlämmt und verrieben, abfiltriert und aus abs. Äthanol/Äther umkristallisiert. Das stark hygroskopische Produkt kann nur über P_2O_5 gelagert werden.

DC: I, II, VI einheitlich

Ausbeute: 3,1g (94%)

Fp.: 95-105°C

$[\alpha]_D^{24} = +6,8^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{12}H_{16}N_3O_6Cl$ (333,73)

Boc-Ala-Thr-Gly-ONp

0,015M (5,0g) Thr-Gly-ONp x HCl und 0,015M (2,9g) Boc-Ala werden in 100ml Chloroform aufgeschlämmt. Bei -20°C werden 0,015M (2,1ml) NMM und 0,021M (3,3g) DCCI in 40ml Chloroform zugegeben. Nach zehn Minuten läßt man auf Zimmertemperatur ansteigen und rührt noch 12 Stunden. Der ausgefallene DCH wird abfiltriert, die Lösung einrotiert, mit Essigester aufgenommen, gekühlt, ungelöstes Produkt wird abfiltriert und das Filtrat mit Eiswasser, gekühlter 5%iger $NaHCO_3$ - und ges. NaCl-Lösung ausgewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Einrotieren wird das Produkt in wenig Essigester aufgenommen, mit Petroläther gefällt und aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

DC: I, II, III einheitlich

Ausbeute: 4,2g (60%)

Fp.: 161-62°C

$[\alpha]_D^{24} = -16,3^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{20}H_{28}N_4O_9$ (468,46)

Ber. C 51,28 H 5,02 N 11,96

Gef. C 51,11 H 5,92 N 12,10

Ala-Thr-Gly-ONp x HCl

0,01M (4,7g) Boc-Ala-Thr-Gly-ONp werden eine halbe Stunde mit 50ml 4N HCl/Dioxan bei Zimmertemperatur behandelt. Das Reaktionsprodukt beginnt schon nach wenigen Minuten auszufallen. Die Reaktionsmischung wird einrotiert, zweimal mit abs. Äther verrieben und gewaschen und aus abs. Äthanol mit abs. Äther gefällt.

DC: I, II, VI einheitlich

Ausbeute: 3,7g (92%)

Fp.: 183-85°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -8,8^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{15}H_{21}N_4O_7Cl$ (404,81)

Ber. C 44,51 H 5,23 N 13,84

Gef. C 44,27 H 5,27 N 13,76

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp

0,01M (4,0g) Ala-Thr-Gly-ONp x HCl und 0,011M (2,1g) Boc-Ala werden in 200ml Chloroform aufgeschlümmt und bei -20°C mit 0,01M (1,4ml) NMM und 0,011M (2,3g) DCCI in 50ml Chloroform versetzt. Das Reaktionsgemisch wird nach zehn Minuten auf Zimmertemperatur gebracht und noch 12 Stunden gerührt. Man filtriert den Rückstand ab, wäscht die Lösung zweimal mit eisgekühlter 1N $NaHCO_3$ -Lösung, mit Eiswasser neutral und einmal mit ges. NaCl-Lösung, trocknet über Na_2SO_4 , filtriert und engt die Lösung ein. Der Rückstand wird in EtOH aufgenommen und der Peptidester mit Äther ausgefällt. Die Umfällung aus Äthanol durch Eingießen in Eiswasser ist ebenfalls möglich. Die Umkristallisation erfolgt aus Äthanol/Äther.

DC: I, II, III einheitlich

Ausbeute: 3,3g (61%)

Fp.: 190°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -19,0^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{23}H_{33}N_5O_{10}$ (539,54)

Ber. C 51,20 H 6,17 N 12,98

Gef. C 51,03 H 6,12 N 13,09

Aminosäureanalyse:

	Ala	Thr	Gly
Ber.	2,0	1,0	1,0
Gef.	2,00	0,99	1,04

Boc-Thr-Gly-ONB (22)

0,05M (11,0g) Boc-Thr, 0,05M (14,6g) Gly-ONB x HBr und 0,05M (6,8g) HBT werden in 200ml DMF gelöst und bei -20°C mit 0,05M (7,0ml) TAA und 0,055M (11,0g) DCCI in 40ml DMF versetzt. Nach zehn Minuten wird die Reaktionslösung aus dem Kältebad entfernt und sechs Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Nach kurzer Kühlung wird der ausgefallene DCH abfiltriert und die Lösung in eisgekühlte ges. NaCl-Lösung gegossen. Das sich abscheidende Öl wird mit Essigester aufgenommen und die vereinigten Extrakte werden mit 1N NaHCO_3 -, 2N KHSO_4 -Lösung, mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Das Produkt wird in abs. Essigester aufgenommen und vorsichtig mit Petroläther gefällt und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

DC: I, III, IV einheitlich

Ausbeute: 16,6g (81%) Fp.: $86-88^{\circ}\text{C}$ Fp_{Lit.}: $86-88^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_D^{24} = -1,9^{\circ}$ (c=1, DMF) Lit.: $-13,0^{\circ}$ (c=1, MeOH)

$= -12,5^{\circ}$ (c=1, MeOH)

$C_{18}H_{25}N_3O_8$ (411,41)

Thr-Gly-ONB x HCl (22)

0,01M (4,1g) Boc-Thr-Gly-ONB werden in 30ml 4N HCl/Dioxan eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Nach dem Einrotieren wird die Substanz mit abs. Äther verrieben und das nun feste Produkt nochmals mit abs. Äther gründlich aufgeschlämmt und gewaschen. Die Umkristallisation erfolgt aus abs. Äthanol/Petroläther.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 3,4g (98%) Fp.: 104-06°C Fp_{Lit.}: 100-03°C
 $[\alpha]_D^{24} = -3,4^\circ$ (c=1, MeOH) Lit.: $-3,6^\circ$ (c=1, MeOH)
 $= -12,7^\circ$ (c=1, DMF)
 $C_{13}H_{18}N_3O_6Cl$ (347,75)

Boc-Ala-Thr-Gly-ONB (22)

0,01M (3,5g) Thr-Gly-ONB x HCl, 0,01M (1,9g) Boc-Ala und 0,01M (1,35g) HBT werden in 100ml DMF gelöst und bei -20°C mit 0,01M (1,4ml) TAA und 0,011M (2,3g) DCCI in 20ml DMF versetzt. Der Reaktionsansatz wird nach zehn Minuten aus dem Kältebad entfernt und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach kurzem Kühlen wird der DCH abfiltriert und das Filtrat in kalte ges. NaCl-Lösung gegossen. Das Produkt wird durch Extraktion in Essigester aufgenommen und die vereinigten Extrakte werden mit 1N NaHCO₃-, 2N KHSO₄-Lösung, Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wird die Lösung einrotiert, in Äthanol aufgenommen und mit Petroläther gefällt.

DC: I,III,IV einheitlich

Ausbeute: 3,8g (79%) Fp.: 70-72°C Fp_{Lit.}: 70-72°C
 $[\alpha]_D^{24} = -9,7^\circ$ (c=1, DMF) Lit.: $-11,3^\circ$ (c=1, DMF)
 $C_{21}H_{30}N_4O_9$ (482,49)

Ala-Thr-Gly-ONB x TFA (22)

0,01M (4,8g) Boc-Ala-Thr-Gly-ONB werden in 30ml TFA eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Nach dem Einengen wird der Rückstand mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben, mit neuem abs. Äther gründlich aufgeschlämmt und gewaschen und aus abs. Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

DC: I,II,IV einheitlich

Ausbeute: 4,8g (96%) Fp.: 115-16°C Fp_{Lit.}: 112-14°C

$[\alpha]_D^{24} = -15,4^\circ$ (c=1, MeOH) Lit: $-12,4^\circ$ (c=1, MeOH)
 $= -9,6^\circ$ (c=1, DMF)
 $C_{18}H_{23}N_4O_9F_3$ (496,39)

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB (22)

0,01M (5,0g) Ala-Thr-Gly-ONB x TFA, 0,01M (1,9g) Boc-Ala und 0,01M (1,35g) HBT werden in 100ml DMF gelöst und bei $-20^\circ C$ mit 0,01M (1,4ml) TAA und 0,011M (2,3g) DCCI in 30ml DMF versetzt. Nach zehn Minuten läßt man auf Zimmertemperatur ansteigen und rührt noch 12 Stunden. Der ausgefallene DCH wird nach kurzem Kühlen abfiltriert und das Filtrat langsam in eisgekühlte ges. NaCl-Lösung gegossen, wobei das Produkt ausfällt. Es wird abgesaugt, gründlich mit Wasser gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert.

DC: I, III, IV einheitlich

Ausbeute: 4,5g (81%) Fp.: $186-87^\circ C$ $Fp_{Lit.}: 186-87^\circ C$
 $[\alpha]_D^{24} = -15,2^\circ$ (c=1, DMF) Lit.: $-15,2^\circ$ (c=1, DMF)
 $C_{24}H_{35}N_5O_{10}$ (553,57)

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-OH

0,05M (27,6g) Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB werden in 500ml Methanol unter Zusatz von Pd/Aktivkohle hydriert bis die theoretische Menge an H_2 aufgenommen ist. Der Katalysator wird abfiltriert und die Lösung auf ein kleines Volumen eingeeengt und vorsichtig mit Äther versetzt ohne daß eine bleibende Trübung auftritt. Nach längerem Stehen kristallisiert das Produkt aus, wird abfiltriert und mit reichlich Äther gewaschen. Die Umkristallisation erfolgt aus Äthanol/Äther/Petroläther.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 18,2g (87%) Fp.: $174-75^\circ C$
 $[\alpha]_D^{24} = -18,3^\circ$ (c=1, DMF)
 $C_{17}H_{30}N_4O_8$ (418,45)

Ber. C 48,80 H 7,23 N 13,39

Gef. C 48,23 H 7,36 N 13,67

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp

0,01M (4,2g) Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-OH und 0,02M (2,8g) p-Nitrophenol werden in 80ml DMF gelöst und bei -20°C mit 0,011M (2,3g) DCCI in 20ml DMF versetzt. Nach zehn Minuten wird die Reaktionslösung aus dem Kältebad entfernt und noch acht Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Nach kurzer Kühlung wird der ausgefallene DCH abfiltriert, die Lösung einrotiert und der Rückstand mit Essigester und Äther verrieben und gewaschen. Die Umkristallisation erfolgt aus Äthanol.

DC: I, III, IV einheitlich

Ausbeute: 1,6g (30%)

Fp.: 189-90°C

$[\alpha]_D^{24} = -22,2^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{23}H_{33}N_5O_{10}$ (539,54)

Ber. C 51,20 H 6,17 N 12,98

Gef. C 51,03 H 6,12 N 13,09

Aminosäureanalyse:

	Ala	Thr	Gly
Ber.	2,0	1,0	1,0
Gef.	2,00	0,94	0,99

3.5. Kondensation der Teilsequenzen zur Gesamtsequenz
1-23

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH

3,4mM (2,6g) Boc-His(Boc)-Cys(S-t-But)-Val-ONp, 3,0mM (1,3g) Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH und 3,0mM (0,4g) HBT werden in 300ml DMF aufgeschlämmt und bei 0°C mit 3,0mM (0,42ml) TAA versetzt. Der Reaktionsansatz wird anschließend eine Woche bei Zimmertemperatur geschüttelt, wobei sich eine gallertige Masse bildet. Diese wird in die zehnfache Menge Eiswasser eingerührt und das ausgefallene Produkt nach 24 Stunden Kühlung abgesaugt. (Der Ansatz kann auch in Essigester gegossen werden. Die weitere Aufarbeitung erfolgt gleichermaßen.) Es wird mit Wasser und Äthanol gründlich nachgewaschen und das unlösliche Produkt in Essigester und Wasser aufgeköcht. Auch

nach einer Wiederholung dieses Waschvorganges bleibt die Substanz mit ungeschütztem Pentapeptid verunreinigt.

DC: nicht einheitlich

Ausbeute: 0,4g (12,6%)

$C_{45}H_{76}N_{10}O_{15}S_2$ (1061,28)

Aminosäureanalyse:	His	Val	Ala	Thr	Cys
Ber.	1,0	1,0	3,0	2,0	1,0
Gef.	0,85	0,88	3,00	1,96	n.b.

Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH

4,7mM (2,0g) Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH, 5mM (3,7g) Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-ONp und 5mM (0,7g) HBT werden in 300ml DMF suspendiert und bei 0°C werden 4,7mM (0,6ml) TAA zugetropft.

Nach einwöchiger Reaktionszeit wird die Aufarbeitung wie oben vorgenommen. Auch hier kann nach mehrfachen Reinigungsversuchen durch Waschen und Kochen in verschiedenen Lösungsmitteln das Produkt nicht frei von eingesetzter Pentapeptidsäure isoliert werden.

DC: nicht einheitlich

Ausbeute: 0,3g (6,2%)

$C_{46}H_{76}N_{10}O_{16}S$ (1057,23)

Aminosäureanalyse:	His	Val	Ala	Thr	Cys
Ber.	1,0	1,0	3,0	2,0	1,0
Gef.	0,71	0,69	3,00	1,93	n.b.

Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

4mM (2,7g) Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA, 4,4mM (3,1g) Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-ONp und 5mM (0,65g) HBT werden in 300ml DMF gelöst und bei 0°C werden 4mM (0,6ml) TAA zugetropft. Nach 48 Stunden Reaktionszeit bei Zimmertemperatur wird die leicht trübe, dickflüssige Lösung in 2l Eiswasser gegossen, noch zwei Stunden gekühlt und das ausgefallene Produkt abfiltriert. Der mit Wasser, Äthanol und Essigester gewaschene Filterkuchen wird über Nacht in Äthanol suspendiert, abgesaugt und mit Äther und Petroläther nachgewaschen.

Das Produkt läßt sich nicht in siedendem Äthanol oder Tetrahydrofuran lösen.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 3,4g (71,4%)

Fp.: 225°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -24,5^\circ$ (c=1, HMPT)

$C_{53}H_{81}N_{11}O_{18}S$ (1192,35)

Eine Elementaranalyse wurde auf der nächsten Stufe durchgeführt.

Aminosäureanalyse:	Thr	Ala	Cys	Val	His
Ber.	2,0	3,0	1,0	1,0	1,0
Gef.	2,03	3,00	n.b.	1,03	1,04

His-Cys(Thp)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x 2 TFA

2,5mM (2,8g) des oben beschriebenen Oktapeptidderivates werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 20ml TFA behandelt. Nach dem Einrotieren wird das entstandene Öl mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben, filtriert und nochmals mit abs. Äther sorgfältig aufgeschlämmt. Die amorphe Substanz wird in 600ml siedendem abs. Äthanol gelöst, langsam abgekühlt, auf ca. 60ml eingengt und langsam mit abs. Äther bis zur Kristallisation versetzt.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 0,9g (29,5%)

Fp.: 205-07°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -20,0^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{47}H_{67}N_{11}O_{18}S F_6$ (1220,17)

Ber. C 46,27 H 5,53 N 12,63

Gef. C 46,22 H 5,50 N 12,97

In Et unlöslich bleiben 1,1g chromatographisch einheitliche Substanz, die auf der Startlinie verbleibt und UV-, Ninhydrin-, Pauly- und Tolidin-positiv ist.

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(Thp)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

0,7mM (0,8g) His-Cys(Thp)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x 2 TFA werden zusammen mit 1,0mM (0,54g) Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp und 0,8mM (0,11g) HBT in 50ml DMF gelöst und bei 0°C mit

1,4mM (0,2ml) TÄA versetzt. Nach zehn Minuten wird das Kältebad entfernt und die nun dickflüssige Lösung drei Tage heftig gerührt. Der Reaktionsansatz wird in einen Liter Eiswasser eingerührt, 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen, der Niederschlag abgesaugt und mit Methanol, Äthanol, Essigester und Petroläther gründlich nachgewaschen. Das gewonnene Produkt ist in geringen Mengen in heißem DMF löslich.

DC: I, II, VI einheitlich

Ausbeute: 0,3g (30,8%) Fp.: 215-17°C

$[\alpha]_D^{24} = -22,1^\circ$ (c=1, HMPT)

$C_{60}H_{93}N_{15}O_{21}S$ (1392,55)

Ber. C 51,75 H 6,73 N 15,09

Gef. C 51,17 H 6,81 N 14,85

Aminosäureanalyse:	Thr	Gly	Ala	Cys	Val	His
Ber.	3,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0
Gef.	2,86	0,97	5,00	n.b.	1,03	0,95

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

4mM (2,7g) Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA, 4,2mM (3,2g) Boc-His(Boc)-Cys(S-t-But)-Val-ONp und 5mM (0,65g) HBT werden in 300ml DMF gelöst und bei 0°C mit 4mM (0,6ml) TÄA versetzt. Die Reaktionslösung wird 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, in 2,5l Eiswasser gegossen und nach sechs Stunden Kühlung abfiltriert. Das gewonnene Produkt wird zweimal aus siedendem Äthanol umkristallisiert und mit Äther und Petroläther gewaschen.

DC: I, II, IV je eine zusätzliche schwache Pauly-positive Bande; evt. Mono-Boc-Derivat

Ausbeute: 3,1g (65,4%) Fp.: 223°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -33,4^\circ$ (c=1, HMPT)

$C_{52}H_{81}N_{11}O_{17}S_2$ (1196,40)

Eine Elementaranalyse wurde auf der nächsten Synthesestufe durchgeführt.

Aminosäureanalyse:	Thr	Ala	Cys	Val	His
Ber.	2,0	3,0	1,0	1,0	1,0
Gef.	1,96	3,00	n.b.	1,01	0,95

His-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x 2 TFA

2,5mM (2,8g) des oben beschriebenen Oktapeptidderivates werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 20ml TFA behandelt und einrotiert. Das erhaltene Öl wird mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben, filtriert und nochmals mit abs. Äther sorgfältig aufgeschlämmt und gewaschen. Die weiße Kristallmasse wird in 300ml siedendem abs. Äthanol gelöst, langsam abgekühlt, auf ca. 50ml einrotiert und vorsichtig durch langsame Zugabe von abs. Äther ausgefällt.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 2,6g (81,7%)

Fp.: 201-02°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -44,2^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{46}H_{67}N_{11}O_{17}S_2F_6$ (1224,22)

Ber. C 45,13 H 5,52 N 12,59

Gef. C 45,43 H 5,36 N 12,60

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

2,0mM (2,5g) His-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-CNB x 2 TFA werden zusammen mit 2,2mM (1,2g) Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp und 2mM (0,27g) HBT in 40ml DMF gelöst und bei 0°C mit 4mM (0,56ml) TAA versetzt. Nach kurzer Zeit beginnt die Lösung zu gelieren und es werden nochmals 60ml DMF zugefügt. Das Kältebad wird entfernt und bei Zimmertemperatur wird drei Tage heftig gerührt. Der Ansatz wird in 1,4l Eiswasser eingerührt, 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen, über eine Nutsche abgesaugt und mit Methanol, Äthanol, Essigester und Petroläther gründlich nachgewaschen. Der Filterkuchen wird erneut in Äthanol aufgerührt, mit der halben Menge Äther versetzt, 12 Stunden im Kühlschrank belassen, abgesaugt und getrocknet.

DC: I, II, VI einheitlich

Ausbeute: 1,9g (68%)

Fp.: 236-37°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -33,9^\circ$ (c=1, HMPT)

$C_{59}H_{93}N_{15}O_{20}S_2$ (1396,60)

Ber. C 50,74 H 6,71 N 15,04

Gef. C 50,53 H 6,55 N 14,62

Aminosäureanalyse:	Thr	Gly	Ala	Cys	Val	His
	Ber. 3,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0
	Gef. 2,88	0,91	5,00	n.b.	1,02	1,02

Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x 2 TFA x H₂O

1,3mM (1,8g) des oben beschriebenen Dodecapeptidderivates werden wie üblich mit 20ml TFA eine halbe Stunde bei Raumtemperatur behandelt, einrotiert und mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben. Die Umkristallisation erfolgt aus siedendem abs. Äthanol und Nachfällung mit Äther.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 1,6g (82%)

Fp.: 196-97°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -37,5^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{58}H_{89}N_{15}O_{23}S_2F_6$ (1542,55)

Ber. C 45,16 H 5,82 N 13,62

Gef. C 44,89 H 5,71 N 13,19

Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

1mM (1,4g) Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(S-t-But)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x 2 TFA werden zusammen mit 2mM (0,72g) Boc-Gln-ONp und 1,1mM (0,15g) HBT in 250ml DMF gelöst und bei 0°C mit 2mM (0,28ml) TAA versetzt. Dabei wird die Lösung sofort trüb, geliert und der Gelee wird innerhalb von 30 Minuten wieder klar. Das Eisbad wird entfernt und der Reaktionsansatz 48 Stunden bei Zimmertemperatur heftig gerührt. Die nun wieder trübe, leicht rührbare Lösung wird in 1,6l Eiswasser eingerührt, 12 Stunden im Kühlschrank stehen gelassen und der flockige Niederschlag auf einer Nutsche gesammelt. Der noch feuchte Filterkuchen wird sorgfältig mit Methanol, Äthanol, Essigester und Petroläther nachgewaschen.

Das so erhaltene Produkt ist schmierig und glasig und wird über CaCl_2 und P_2O_5 getrocknet. Da das Produkt nur schwer abzusaugen ist und in siedendem DMF nur wenig löslich ist, wurden weitere Reinigungsversuche nicht durchgeführt.

DC: I, II, IV, VI einheitlich

Ausbeute: 1,1g (72,4%) Fp.: 244°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -60,6^\circ$ (c=1, HMPT)

$\text{C}_{64}\text{H}_{101}\text{N}_{17}\text{O}_{22}\text{S}_2$ (1524,73)

Ber. C 50,42 H 6,68 N 15,62

Gef. C 49,48 H 6,66 N 14,83

Aminosäureanalyse:	Thr	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	His
Ber.	3,0	1,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0
Gef.	2,91	0,96	0,92	5,00	n.b.	1,05	0,99

Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

4mM (2,7g) Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x TFA, 4,4mM (3,5g)

Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-ONp und 5mM (0,65g) HBT werden

in 300ml DMF gelöst (es bleibt eine schwache Trübung) und

bei 0°C werden 4mM (0,6ml) TAA zugetropft. Nach 24 Stunden

Reaktionsdauer bei Raumtemperatur beginnt das Produkt aus-

zufallen. Nach weiteren 24 Stunden wird der flockige Nieder-

schlag abgesaugt und mit Äthanol, Essigester und Äther nach-

einander gründlich aufgeschlämmt und sorgfältig gewaschen,

eine Umkristallisation ist nicht möglich. Nach dem Zerreiben

der getrockneten Masse im Mörser erhält man ein weißes Pul-

ver.

DC: II, VI einheitlich

Ausbeute: 3,5g (71,4%) Fp.: 226°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -25,3^\circ$ (c=1, HMPT)

$\text{C}_{56}\text{H}_{81}\text{N}_{11}\text{O}_{18}\text{S}$ (1228,39)

Eine Elementaranalyse wurde auf der nächsten Stufe durchgeführt.

Aminosäureanalyse:	Thr	Ala	Cys	Val	His
Ber.	2,0	3,0	1,0	1,0	1,0
Gef.	1,98	3,00	n.b.	1,02	1,01

His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x 2 TFA

2,5mM (3,0g) des oben beschriebenen Oktapeptidderivates werden eine halbe Stunde bei Raumtemperatur mit 30ml TFA behandelt. Nach dem Einrotieren wird das ölige Rohprodukt mit abs. Äther verrieben und die dabei entstehende Kristallmasse noch zweimal sorgfältig mit abs. Äther aufgeschlämmt und gründlich gewaschen. Auf Grund der geringen Löslichkeit ist eine Umkristallisation aus Äthanol nicht geeignet. Eine Umfällung aus DMF mit Äther zeigt keine zusätzliche Reinigung.

DC: I, II, IV einheitlich, in VI eine schwache Tolidinpositive Bande zusätzlich

Ausbeute: 2,9g (92,3%) Fp.: 200-02°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -20,7^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{50}H_{67}N_{11}O_{18}S F_6$ (1256,20)

Ber. C 47,81 H 5,38 N 12,27

Gef. C 49,31 H 5,51 N 12,73

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

2,5mM (3,1g) His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x 2 TFA werden zusammen mit 3mM (1,6g) Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp und 2,5mM (0,34g) HBT in 80ml DMF gelöst und bei 0°C werden 5mM (0,7ml) TAA zugetropft. Nach wenigen Minuten wird das Eisbad entfernt und die gallertige Lösung drei Tage bei Zimmertemperatur heftig gerührt. Dann wird der Reaktionsansatz in 1,4l Eiswasser gegossen, 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen und das ausgefallene Produkt auf einem Filter gesammelt. Es wird mit Methanol, Äthanol, Essigester und Petroläther nachgewaschen und der Filterkuchen erneut in Äthanol aufgerührt, mit der halben Menge Äther versetzt, 12 Stunden im Kühlschrank belassen, abgesaugt und getrocknet.

DC: I, II, VI einheitlich

Ausbeute: 2,6g (72,8%) Fp.: 241°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -25,7^\circ$ (c=1, HMPT)

$C_{63}H_{93}N_{15}O_{21}S_5$ (1428,58)

Ber. C 52,97 H 6,56 N 14,71

Gef. C 52,54 H 6,55 N 14,24

Aminosäureanalyse:	Thr	Gly	Ala	Cys	Val	His
Ber.	3,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0
Gef.	2,83	0,90	5,00	n.b.	1,03	0,97

Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB
x 2 TFA x H₂O

1,4mM (2,0g) des oben beschriebenen Dodecapeptidderivates werden wie üblich mit 20ml TFA eine halbe Stunde bei Raumtemperatur behandelt, einrotiert und mit abs. Äther trocken gerieben. Die Umkristallisation erfolgt aus siedendem abs. Äthanol und Zugabe von Äther.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 1,9g (94%

Fp.: 191-93°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -24,3^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{62}H_{89}N_{15}O_{24}S_6F_6$ (1574,52)

Ber. C 47,30 H 5,70 N 13,34

Gef. C 47,25 H 5,47 N 12,73

Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-
Thr-Ala-ONB

1,5mM (2,15g) Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x 2 TFA werden zusammen mit 3mM (1,1g) Boc-Gln-ONp und 2mM (0,27g) HBT in 150ml DMF gelöst und bei 0°C mit 3,0mM (0,42ml) TAA versetzt. Der nun trübe und anfangs geleeartige Reaktionsansatz wird aus dem Eisbad entfernt und bei Raumtemperatur 48 Stunden heftig gerührt. Dann wird das Reaktionsgemisch in 1,5l Essigester eingerührt und nach sechs Stunden Stehen um Kühltisch das ausgefallene Produkt abfiltriert. Die Reinigung erfolgt durch Waschen mit Äthanol, Äther und Petroläther. Die Löslichkeit in siedendem DMF ist gering.

DC: I, II, IV, VI einheitlich

Ausbeute: 2,0g (85,7%) Fp.: 238-40°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -22,1^\circ$ (c=1, HMPT)

$C_{68}H_{101}N_{17}O_{23}S$ (1556,71)

Ber. C 52,47 H 6,54 N 15,30

Gef. C 52,04 H 6,54 N 14,99

Aminosäureanalyse: Thr Glu Gly Ala Cys Val His

Ber. 3,0 1,0 1,0 5,0 1,0 1,0 1,0

Gef. 2,90 0,95 0,92 5,00 n.b. 1,03 0,91

Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-
ONB x 2 TFA

1mM (1,6g) des acylierten Traidecapeptides werden wie üblich mit 10ml TFA behandelt. Die Reinigung erfolgt durch gründliches Waschen mit abs. Äther.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 1,65g (98%)

Fp.: 211-12°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -22,7^\circ$ (c=1, HMPT)

$C_{67}H_{95}N_{17}O_{25}S F_6$ (1684,64)

Ber. C 47,77 H 5,68 N 14,13

Gef. C 47,48 H 5,79 N 13,48

Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-
Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

a) Bereitung der Carboxylkomponente:

Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-ONp

5mM (4,3g) Boc-Gln(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH und 7mM (1,0g) p-Nitrophenol werden in 50ml DMF gelöst und bei -20°C mit 5,5mM (1,13g) DCCI in 20ml DMF versetzt. Nach einer halben Stunde wird das Kältebad entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach kurzer Kühlung wird der ausgefallenen DCH abfiltriert und das Filtrat in ca. 400ml Essigester eingerührt. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt und aus Äthanol umkristallisiert.

DC: I, III minimale Verunreinigung mit Ausgangsprodukt,
die auch durch mehrfache Umkristallisation
nicht entfernt werden kann.

Ausbeute: 3,2g (65,5%) Fp.: 217-27°C

$[\alpha]_D^{24} = -16,9^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{47}H_{60}N_8O_{15}$ (977,04)

Ber. N 11,47

Gef. N 11,48

b) Kupplungsreaktion

0,6mM (1,0g) Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONS x 2 TFA werden in 50ml DMF gelöst. Anschließend werden 1mM (1,0g) Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-ONp und 1mM (0,14g) HBT, gelöst in 20ml DMF, zugegeben. Bei 0°C werden 1,2mM (0,17ml) TAA zur Reaktionslösung getropft. Es bildet sich ein klares Gel, das mit 50ml DMF verflüssigt wird und 48 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt wird. Der gallertige Ansatz wird in 1,5l Essigester eingerührt und nach 12 Stunden der weiße Niederschlag abgesaugt und mit Äthanol, Äther und Petroläther nachgewaschen. Das weiße Pulver wird nochmals zur Entfernung von überschüssigem Hexapeptid in 50ml DMF aufgerührt, bis sich ein klares Gel gebildet hat und die Reinigungsprozedur wiederholt. Dabei fällt das Produkt in reiner Form an.

DC: I, II, IV, VI einheitlich

Ausbeute: 1,0g (72,5%) Fp.: 245-46°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -15,8^\circ$ (c=1, HMPT)

$C_{104}H_{148}N_{24}O_{33}S$ (2294,52)

Ber. C 54,44 H 6,50 N 14,65

Gef. C 53,77 H 6,41 N 14,37

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Phe	His
Ber.	3,0	1,0	3,0	2,0	5,0	1,0	2,0	1,0	1,0
Gef.	2,91	0,97	3,02	2,00	5,00	n.b.	1,98	0,98	1,01

Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys-
(S-t-But)--Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x 2 TFA

0,3mM (0,7g) des acylierten Nonadeca-peptides werden wie
 üblich mit 10ml TFA behandelt. Die Reinigung erfolgt durch
 gründliches Waschen mit abs. Äther. Man erhält ein Produkt,
 das nur schwer in heißem DMF und HMPT löslich ist.

DC: Die Substanz bleibt in allen getesteten Laufmitteln
 auf der Startlinie liegen.

Ausbeute: 0,7g (96,3%) Fp.: 233-34°C (Z)
 $[\alpha]_D^{24} = -10,4^\circ$ (c=1, HMPT)
 $C_{103}H_{142}N_{24}O_{35}S F_6$ (2422,45)
 Ber. C 51,07 H 5,91 N 13,88
 Gef. C 49,47 H 5,69 N 13,16

Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-
Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

a) Bereitung der Carboxylkomponente

Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-ONp
 2mM (2,8g) der Peptidsäure und 4mM (0,56g) p-Nitrophenol
 werden in 50ml DMF gelöst und bei -20°C mit 3mM (0,6g)
 DCCI in 20ml DMF versetzt. Nach einer halben Stunde wird
 das Kältebad entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur ge-
 rührt. Nach kurzer Kühlung wird der ausgefallene DCH abfil-
 triert und das Filtrat in ca. 500ml Essigester eingerührt.
 Nach weiteren sechs Stunden Kühlung wird der feine, flockige
 Niederschlag abzentrifugiert und nacheinander je zweimal
 in Äthanol, Essigester und Äther aufgeschlämmt und abzentrif-
 fugiert. Dann wird das Produkt in Petroläther aufgerührt
 und abfiltriert und man erhält ein lockeres weißes Pulver.

DC: I, VI einheitlich

Ausbeute: 2,5g (82%) Fp.: 210-15°C
 $[\alpha]_D^{24} = -16,6^\circ$ (c=1, DMF) (unscharf)
 $C_{76}H_{95}N_{13}O_{21}$ (1526,66)
 Ber. C 59,79 H 6,27 N 11,93
 Gef. C 59,28 H 6,23 N 11,86

b) Kupplungsreaktion

0,3mM (0,5g) Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB x 2 TFA werden in 50ml DMF gelöst. Dazu gibt man eine Lösung von 0,33mM (0,5g) der oben bereiteten Carboxylkomponente und 0,35mM (0,05g) HBT in 20ml DMF und bei 0°C werden 0,6mM (0,08ml) TAA zugesetzt. Die gelierende Lösung wird dann 48 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt und in ca. 800ml Äthanol eingerührt. Nach zweistündigem Rühren unter Kühlung wird der feine, flockige Niederschlag abzentrifugiert, je zweimal in Äthanol, Essigester und Äther aufgeschlämmt, abzentrifugiert und zuletzt in Petroläther aufgerührt und abfiltriert. Das so erhaltene lockere weiße Pulver ist nur noch bedingt in warmem HMPT löslich.

DC: Das Produkt bleibt in allen getesteten Fließmitteln auf der Startlinie sitzen oder ergibt Schwanzbildung.

Ausbeute: 0,6g (71%) - Fp.: 241-42°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -23,3^\circ$ (c=1, HMPT)

$C_{133}H_{182}N_{28}O_{39}S$ (2829,14)

Ber. C 56,46 H 6,48 N 13,86

Gef. C 56,47 H 6,80 N 13,69

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Phe
Ber.	3,0	1,0	3,0	1,0	3,0	5,0	1,0	3,0	1,0
Gef.	3,00	0,98	3,01	0,96	3,00	5,14	n.b.	2,86	1,05

	Lys	His
Ber.	1,0	1,0
Gef.	0,99	1,03

3.6. Vorbereitung zur Synthese der gesamten Partialsequenz 1-27

3.6.1. Synthese der Sequenz 19-23 (Ala-Thr-Ala-Thr-Ala)

Boc-Thr-Ala-ONp

0,03M (6,6g) Boc-Thr und 0,03M (7,4g) Ala-ONp x HCl werden in 100ml Chloroform aufgeschlämmt und bei -20°C mit 0,03M (4,2ml) NMM und 0,032M (6,6g) DCCI in 50ml Chloroform versetzt. Nach zehn Minuten wird das Kältebad entfernt und der Ansatz über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach kurzem Kühlen wird der ausgefallene DCH abfiltriert, die Lösung einrotiert, in Essigester aufgenommen und erneut vom DCH befreit. Das Essigesterfiltrat wird mit eisgekühlter 1N NaHCO_3 - und ges. NaCl-Lösung sorgfältig gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert und aus Essigester mit Petroläther gefällt. Die Umkristallisation erfolgt ebenfalls aus Essigester/Petroläther.

DC: I, III, VI

Ausbeute: 8,8g (71,4%) Fp.: $79-80^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_D^{24} = -42,7^{\circ}$ (c=1, DMF)

$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8$ (441,41)

Ber. C 52,55 H 6,13 N 10,21

Gef. C 52,99 H 6,19 N 10,07

Thr-Ala-ONp_x HCl

0,02M (8,8g) Boc-Thr-Ala-ONp werden eine halbe Stunde mit 4N HCl/Dioxan bei Raumtemperatur behandelt, einrotiert und mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben. Nach weiterem gründlichen Aufschlämmen und Waschen mit abs. Äther wird das Produkt aus abs. Äthanol mit abs. Äther gefällt. Die stark hygroskopische Substanz kann nur wenige Wochen i.V. über P_2O_5 gelagert werden.

DC: I, II, VI einheitlich

Ausbeute: 3,6g (94%)

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_6\text{Cl}$ (347,75)

Boc-Ala-Thr-Ala-ONp

O,012M (2,3g) Boc-Ala und O,012M (4,3g) Thr-Ala-ONp x HCl werden in 80ml Chloroform gelöst und bei -20°C mit O,01M (1,7ml) NMM und O,013M (2,7g) DCCI in 20ml Chloroform versetzt.

Nach 12 Stunden Reaktionsdauer bei Raumtemperatur wird die Lösung wieder kurz gekühlt, der DCH abfiltriert, einrotiert und das zurückgebliebene Öl in Essigester aufgenommen. Nachdem erneut vom DCH befreit, wird die Lösung mit eisgekühlter 1N NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung sorgfältig gewaschen, getrocknet, einrotiert und zwecks Fällung mit Petroläther in wenig Äthanol/Äther im Verhältnis 1:2 aufgenommen. Die Umkristallisation erfolgt nach dem gleichen Verfahren.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 4,1g (70,8%) Fp.: 96-98°C

$[\alpha]_D^{24} = -40,1^\circ$ (c=1, DMF)

C₂₁H₃₀N₄O₉ (482,49)

Ber. C 52,28 H 6,27 N 11,61

Gef. C 52,49 H 6,41 N 11,57

Ala-Thr-Ala-ONp x HCl

O,01M (4,8g) Boc-Ala-Thr-Ala-ONp werden eine halbe Stunde mit 4N HCl/Dioxan bei Raumtemperatur behandelt, einrotiert und mit abs. Äther bis zur Trockene verrieben, abfiltriert, erneut in abs. Äther aufgeschlämmt und gründlich gewaschen. Die Umfällung gelingt aus abs. Äthanol mit abs. Äther.

DC: I, II, VI einheitlich

Ausbeute: 3,9g (93%) Fp.: 135-36°C

$[\alpha]_D^{24} = -46,5^\circ$ (c=1, DMF)

C₁₆H₂₃N₄O₇Cl (418,83)

Ber. C 45,88 H 5,54 N 13,38

Gef. C 44,87 H 5,39 N 12,95

Boc-Ala-Thr-Ala-OH

0,01M (5,0g) Boc-Ala-Thr-Ala-ONB werden in 100ml Äthanol gelöst und über Pd/Aktivkohle hydriert bis die berechnete Menge H_2 aufgenommen ist. Der Katalysator wird abfiltriert und das Filtrat einrotiert. Das zurückgebliebene Öl wird in 50ml 1N $NaHCO_3$ -Lösung aufgenommen, dreimal mit Äther ausgewaschen, mit 2N $KHSO_4$ unter Eiskühlung vorsichtig auf pH 3 angesäuert und das Produkt mit Essigester dreimal extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden wie üblich getrocknet, einrotiert und die Peptidsäure aus Essigester mit Petroläther gefällt.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 2,8g (77,5%)

Fp.: 83-84°C

$[\alpha]_D^{24} = -13,7^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{15}H_{27}N_3O_7$ (361,39)

Ber. C 49,85 H 7,53 N 11,63

Gef. C 49,87 H 7,47 N 11,12

Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONp

0,01M (3,6g) Boc-Ala-Thr-Ala-OH und 0,01M (3,5g) Thr-Ala-ONp x HCl werden in 100ml Chloroform aufgeschlämmt und bei -20°C mit 0,01M (1,4ml) NMM und 0,012M (2,4g) DCCI in 50ml Chloroform versetzt. Nach zehn Minuten wird das Kältebad entfernt, der Reaktionsansatz 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das mit DCH verunreinigte Produkt abfiltriert. Die Chloroform-Lösung wird einrotiert und der Rückstand zusammen mit der Hauptmenge des Produktes kurzzeitig in heißem Äthanol gelöst, filtriert und mit Äther/Petroläther das Peptid ausgefällt. Die Umkristallisation erfolgt aus Äthanol/Essigester mit Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 2,3g (36%)

Fp.: ab ca. 180°C

$[\alpha]_D^{24} = -20,4^\circ$ (c=1, DMF)

Braunfärbung (Z)

weitere Angaben s.S. 98

Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH

O,01M (6,7g) Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB werden in 200ml Äthanol gelöst und über Pd/Aktivkohle hydriert bis die berechnete Menge H_2 aufgenommen ist. Der Katalysator wird abfiltriert, das Filtrat auf das halbe Volumen eingeeengt und die Peptidsäure mit Äther/Petroläther ausgefällt. Die Umkristallisation erfolgt ebenfalls aus Äthanol durch Zugabe von Äther und Petroläther.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 4,1g (77%)

Fp.: 210-11°C (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -14,6^\circ$ (c=1, DMF)

$C_{22}H_{39}N_5O_{10}$ (533,58)

Ber. C 49,52 H 7,37 N 13,13

Gef. C 49,18 H 7,21 N 12,86

Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONp

O,01M (5,4g) Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-OH und O,02M (2,8g) p-Nitrophenol werden in 100ml DMF gelöst und bei -20°C mit O,012M (2,5g) DCCI in 20ml DMF versetzt. Nach zehn Minuten wird das Kältebad entfernt und der Ansatz über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach kurzer Kühlung wird der ausgefallene DCH abfiltriert, das Filtrat mit der dreifachen Menge Äther versetzt und das Rohprodukt mit Petroläther ausgefällt. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Äthanol mit Äther/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 3,8g (58%)

Fp.: ab ca. 180°C

$[\alpha]_D^{24} = -14,2^\circ$ (c=1, DMF)

Braunfärbung. (Z)

$C_{28}H_{42}N_6O_{12}$ (654,67)

Ber. C 51,37 H 6,47 N 12,84

Gef. C 50,78 H 6,44 N 12,67

3.6.2. Synthesen zur Sequenz 24-27 (Gln-Ile-Met-Lys)

Boc-Ile-Met-ONp

O,01M (2,3g) Boc-Ile und O,01M (3,1g) Met-ONp x HCl werden in 80ml Chloroform gelöst und bei -20°C mit O,01M (1,4ml) NMM und anschließend mit O,011M (2,2g) DCCI in 20ml Chloroform versetzt. Nach zehn Minuten wird das Kältebad entfernt, der Reaktionsansatz sechs Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, der ausgefallene DCH abfiltriert und das Filtrat einrotiert. Das zurückgebliebene Öl wird in Essigester aufgenommen, mit eisgekühlter 1N NaHCO_3 - und halbges. NaCl-Lösung sorgfältig gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert und aus Essigester mit Petroläther umkristallisiert.

DC: I, III, VI einheitlich

Ausbeute: 3,5g (72,4%)

Fp.: $135-136^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -55,7^{\circ}$ (c=1, DMF)

$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ (483,58)

Ber. N 8,69

Gef. N 8,23

Boc-Ile-Met-OH

O,05M (7,5g) Met werden zusammen mit O,05M (7,0ml) TAA in 100ml DMF bei 0°C aufgeschlämmt und mit einer Lösung von O,05M (17,6g) Boc-Ile-ONp und O,05M (7,0g) HBT in 100ml DMF versetzt. Nach drei Tagen Reaktionszeit wird das nicht umgesetzte Met abfiltriert, das Filtrat in ca. 500ml Eiswasser eingerührt, die noch alkalische Lösung mit Äther zweimal gewaschen, mit 1N KHSO_4 unter Eiskühlung auf pH 3 vorsichtig angesäuert und mit Essigester dreimal extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert und das Produkt wird aus Essigester mit Petroläther gefällt.

DC: I, II, IV einheitlich

Ausbeute: 10,6g (58,5%)

Fp.: $146-147^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +5,5^{\circ}$ (c=1, DMF)

$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (362,49)

Ber. N 7,73

Gef. N 7,78

C Literaturverzeichnis

- (1) F.Schneider und L.Flohe,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348, 540-552 (1967);
L.Flohé,W.Gunzler,G.Jung,E.Schaich und F.Schneider,
diese Z. 352, 159-169 (1971);
L.Flohé,E.Schaich,W.Voelter und A.Wendel,
diese Z. 352, 170-180 (1971)
- (2) H.G.Löffler,F.Schneider und H.Wenck,
Z.Naturforsch. 26 b, 43-46 (1971)
- (3) W.P.Jencks: Catalysis in Chemistry and Enzymologie,
McGraw-Hill Book Comp., New York 1969
- (4) T.C.Bruice,S.J.Benkovic: Bioorganic Mechanisms I u. II,
W.A.Benjamin, Inc., New York 1966
- (5) M.L.Bender: Mechanisms of Homogeneous Catalysis from
Protons to Proteins,
Wiley-Interscience, J.Wiley & Sons, New York 1971
- (6) M.Friedman: The Chemistry and Biochemistry of the
Sulphydryl Groups in Amino Acids, Peptides and Proteins,
Pergamon Press, Oxford, New York, Braunschweig 1973;
P.C.Jocelyn: Biochemistry of the SH-Group,
Academic Press, London-New York 1972
- (7) The Chemistry of Heterocyclic Compounds,
K.Hofmann: Imidazole and Its Derivatives Part I,
Interscience Pub.Inc., New York 1953
- (8) F.Schneider und H.Wenck,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348, 1221-24 (1967)
- (9) F.Schneider, loc.cit.(8) 334, 26-43 (1963)
- (10) F.Schneider, loc.cit.(8) 338, 131-144 (1964)
- (11) F.Schneider,E.Schaich und H.Wenck,
loc.cit.(8) 349, 1525-28 (1968)
- (12) F.Schneider und H.Wenck,
loc.cit.(8) 350, 1521-30 und 1653-61 (1969)
- (13) E.Ziegler,H.Wenck und F.Schneider,
Z.Naturforsch. 25 b, 1417-20 (1970), 26 b, 1010-16 (1971)
- (14) F.Schneider,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348, 1034-42 (1967)

- (15) T.Y.Liu, W.H.Stein, S.Moore und S.D.Elliott,
J.Biol.Chem. 240, 1143-49 (1965)
- (16) E.Schaich und F.Schneider,
in H.Nesvadba, ed., Peptides 1971, S. 127-31,
North-Holland, Publ.Comp., Amsterdam 1973
- (17) R.B.Merrifield, Federation Proc. 21, 412 (1962)
- (18) J.M.Stewart und J.D.Young:
Solid Phase Peptide Synthesis,
W.H.Freeman Comp., San Francisco 1969
- (19) G.R.Stark: Biochemical Aspects of Reactions on
Solid Supports, Academic Press, New York 1971
- (20) E.Schaich und F.Schneider in
H.Hanson und H.D.Jakubke, ed., Peptides 1972, S. 180-84,
North-Holland, Publ.Comp., Amsterdam 1973
- (21) E.Schaich, A.M.Fretzdorff und F.Schneider,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354, 897-902 (1973)
- (22) E.Schaich, Dissertation, Univ. Marburg (1973)
- (23) G.R.Marshall und R.B.Merrifield,
Biochem. 4, 2394-411 (1965)
- (24) F.Weygand und U.Ragnarsson,
Z.Naturforsch. 21 b, 1141-44 (1966);
F.Weygand in E.Bricas, ed., Peptides 1968, S. 183-84,
North-Holland Publ.Comp., Amsterdam 1968
- (25) G.S.Omenn und C.B.Anfinson,
J.Am.Chem.Soc. 90, 6571-72 (1968)
- (26) S.Visser und K.E.T.Kerling,
Recl.Trav.Chim.Pays-Bas 89, 880-84 (1970)
- (27) U.Weber und M.Andre in Peptides 1974,
Vortrag zum 13. Europäischen Peptid-Symposium
in Kiryat Anavim (Israel) 1974
- (28) B.I.Gerwin, J.Biol.Chem. 242, 451-56 (1967);
T.Y.Liu, diese Z. 242, 4029-32 (1967)
- (29) W.K.Park, R.R.Smeby und F.M.Bumpus,
Biochem. 6, 3458-64 (1967)
- (30) H.Zahn und H.Schüssler,
Liebigs Ann.Chem. 641, 176-83 (1961)
- (31) E.Schaich und F.Schneider,
Z.Naturforsch. 29 c, 457-63 und 464-68 (1974)

- (32) R.Gramer, D.J.Schäfer und G.T.Young
in E.Scoffone, ed., Peptides 1969, S. 102-08,
North-Holland Publ.Comp., Amsterdam 1971
- (33) G.W.Anderson und F.W.Callahan,
J.Am.Chem.Soc. 82, 3359-63 (1960)
- (34) M.Bodanszky, Nature 175, 685 (1955);
M.Bodanszky und V.du Vigneaud,
J.Am.Chem.Soc. 81, 5688-91 (1959)
- (35) G.W.Anderson, F.M.Callahan und J.E.Zimmerman,
J.Am.Chem.Soc. 85, 3039 (1963) und 86, 1839-42 (1964)
- (36) T.Curtius, Ber.Deut.Chem.Ges. 35, 3226-28 (1902)
- (37) G.W.Anderson, J.E.Zimmerman und F.M.Callahan,
J.Am.Chem.Soc. 88, 1338-39 (1966)
- (38) J.Honzel und J.Rudinger,
Coll.Czech.Chem.Comm. 26, 2333 (1961)
- (39) J.C.Sheehan und G.P.Hess,
J.Am.Chem.Soc. 77, 1067-68 (1955)
- (40) D.S.Kemp in loc.cit.(16), S. 1-19
- (41) K.Lübke, E.Schröder und G.Kloss: Chemie und Biochemie
der Aminosäuren, Peptide und Proteine I,
S. 144-46, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1975
- (42) E.Wünsch et al., Z.Naturforsch. 28 c, 235-40 (1973);
E.Wünsch et al. in Peptides 1974, Vortrag zum 13.
Europäischen Peptid-Symposium in Kiryat Anavim
(Israel) 1974
- (43) E.Jaeger in E.Müller, Houben-Weyl
Methoden der org. Chemie, Synthese von Peptiden II,
S. 454-730, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974
- (44) T.Wieland und H.Bernhard,
Liebigs Ann.Chem. 572, 190-94 (1951);
H.Determann und T.Wieland, diese Z. 670, 136-40 (1963)
- (45) R.A.Boissonnas, Helv.Chim.Acta 34, 874-79 (1951);
Jr.J.R.Vaughan, J.Am.Chem.Soc. 73, 3547 (1951)
- (46) H.C.Beyerman in J.Meienhofer, ed., Chemistry and
Biology of Peptides, S. 351-57,
Ann Arbor Science Publ., Michigan 1972

- (47) M.A.Tilak, L.M.Hendricks und D.S.Wendel in
S.Lande, ed., Progress in Peptid Research, Vol. 2,
S. 351-59, Gordon and Breach, New York 1972
- (48) F.Weygand, P.Huber und K.Weiss,
Z.Naturforsch. 22 b 1084-85 (1967);
F.Weygand und C.Di Bello, diese Z. 24 b, 314-17 (1969)
- (49) F.Flor, C.Birr und T.Wieland,
Liebigs Ann.Chem. 1601-5 (1973)
- (50) W.König und R.Geiger, Chem.Ber. 106, 3626-35 (1973)
- (51) J.Pless und R.A.Boissonnas,
Helv.Chim.Acta 46, 1609-25 (1963)
- (52) G.Kupryszewski und M.Formela,
Rocz.Chem. 35, 1533 (1961)
- (53) J.Kovacs, R.Giannotti und A.Kapoor,
J.Am.Chem.Soc. 88, 2282-92 (1966);
J.Kovacs, M.Q.Ceprini, C.A.Dupraz und G.N.Schmit,
J.Org.Chem. 32, 3696-98 (1957)
- (54) J.Kovacs, L.Kisfaludy und M.Q.Ceprini,
J.Am.Chem.Soc. 89, 183-84 (1967)
- (55) J.Kovacs, L.Kisfaludy und M.Q.Ceprini in
H.C.Beyerman, A.van de Linde und W.M.van den Brink,
ed., Peptides 1966, S. 23-24,
North-Holland Publ., Amsterdam 1967;
L.Kisfaludy, M.Q.Ceprini, B.Rakoczy und J.Kovacs,
diese Lit., S. 25-27
- (56) L.Kisfaludy, O.Nyeki, T.Szirtes, loc.cit.(16), S.54-59
J.Kovacs, L.Kisfaludy, M.Q.Ceprini und R.H.Johnson,
Tetrahedron 25, 2555-73 (1969)
- (57) G.Wendelberger in E.Müller; Houben-Weyl:
Methoden der org. Chem., Synthese von Peptiden II,
S. 55-58, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974
- (58) M.Bodanszky et al. in loc.cit.(46), S. 203-07
- (59) T.Wieland in loc.cit.(32), S. 3-6
- (60) M.Bodanszky, N.J.Williams,
J.Am.Chem.Soc. 89, 685-89 (1967);
M.Bodanszky, M.A.Ondetti, S.D.Levine und N.J.Williams,
J.Am.Chem.Soc. 89, 6753-57 (1967)

- (61) J.Meienhofer et al. in Peptides Proc., First American Peptide Symposium 1968, S. 419 ff., M.Dekker Inc., New York 1970
- (62) W.König und R.Geiger, Chem.Ber. 103, 788-98; G.Jäger,R.Geiger,H.Wissmann und W.König, Chem.Ber. 107, 215-231 (1974)
- (63) F.Weygand,D.Hoffmann und E.Wünsch, Z.Naturforschg. 21 b, 426-28 (1966)
- (64) E.Wünsch, Z.Naturforschg. 22 b, 1269-76 (1967); E.Wünsch,A.Zwick und A.Fontana, Chem.Ber. 101, 326-35 (1968); E.Wünsch,A.Zwick und E.Jaeger, diese Z. 101, 336-40 (1968); E.Wünsch und G.Wendelberger, diese Z. 101, 341-45 und 3659-63 (1968); E.Wünsch,E.Jaeger und R.Scharf, Chem.Ber. 101, 3664-70 (1968)
- (65) R.Geiger,G.Jäger,W.König und G.Treuth, Chem.Ber. 106, 188-192, 2347-52 (1973) W.König, Chem.Ber. 106, 193-98 (1973); R.Geiger und A.Volk, Chem.Ber. 106, 199-205 (1973); G.Jäger, Chem.Ber. 106, 206-10 (1973); R.Geiger,G.Treuth und F.Burow, Chem.Ber. 106, 2339-46 (1973)
- (66) E.Wünsch, Naturwissenschaften 59, 239-46 (1972); E.Wünsch,G.Wendelberger und A.Högel, Chem.Ber. 104, 2430-44 (1971); E.Wünsch,G.Wendelberger und P.Thamm, Chem.Ber. 104, 2445-53 (1971); E.Wünsch und P.Thamm, Chem.Ber. 104, 2454-57 (1971); E.Wünsch,G.Wendelberger und R.Spangenberg, Chem.Ber. 104, 3854-58 (1971); E.Wünsch und G.Wendelberger, Chem.Ber. 105, 2508-14 (1972) E.Wünsch,E.Jäger,M.Deffner,R.Scharf und P.Lehnert, Chem.Ber. 105, 2515-22 (1972)

- (67) D.J.Schäfer, G.T.Young, D.F.Elliott und R.Wade,
J.Chem.Soc.(C), 46-49 (1971);
R.Garner und G.T.Young,
J.Chem.Soc.(C), 50-53 (1971);
G.A.Fletscher und G.T.Young in loc.cit.(16), S.82-88
- (68) W.König und R.Geiger in loc.cit.(32), S. 17-22
- (69) E.Schröder und K.Lübke, The Peptides Vol.I, S. 108-11,
Academic Press, New York-London 1965
- (70) H.Gross und L.Bilk in E.Bricas, ed., Peptides 1968,
S.156-58, North-Holland Pub., Amsterdam 1968;
H.Gross und L.Bilk, Tetrahedron 24, 6935-39 (1968)
- (71) F.Weygand, W.Steglich und N.Chytil,
Z.Naturforschg. 23 b, 1391-92 (1968)
- (72) M.Bodanszky und M.Ondetti: Peptide Synthesis, S.21-41,
Interscience Pub., New York 1966
- (73) L.Zervas, I.Photaki, C.Yovanidis, J.Taylor, I.Phocas
und V.Bardakos in loc.cit.(55), S. 28-37
- (74) D.N.Reinhoudt, D.A.Hoogwater und H.C.Beyerman in
loc.cit.(32), S. 7-11
- (75) L.Zervas, D.Borovas und E.Gazis,
J.Am.Chem.Soc. 85, 3660-66 (1963)
- (76) G.Goerdeler und A.Holst, Angew.Chem. 71, 775 (1959)
- (77) J.Meienhofer, Nature 205, 73-75 (1965)
- (78) J.Föhles, Dissertation, TH Aachen 1972;
E.Wünsch und A.Fontana, Chem.Ber. 101, 323-25 (1968)
- (79) P.Sieber und B.Iselin, Helv.Chim.Acta 51, 622-32 (1968)
- (80) W.L.Haas, E.V.Krumkalns und K.Gerzon,
J.Am.Chem.Soc. 88, 1988-92 (1966)
- (81) S.Sakakibara, M.Shin, M.Fujino, Y.Shimonishi, S.Inoue
und N.Inukai, Bull.Chem.Soc.J. 38, 1522-25 (1965);
I.Honda, Y.Shimonishi und S.Sakakibara,
diese Z. 40, 2415-18 (1967)
- (82) G.Jäger und R.Geiger in loc.cit.(16), S. 78-81,
North-Holland Pub., Amsterdam 1973
- (83) E.Wünsch in E.Müller, Houben-Weyl,
Methoden der org. Chemie, Synthese von Peptiden I,
S. 69-91, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974

- (84) R.Schwyzer, P.Sieber und K.Zatsko,
Helv.Chim.Acta 41, 491-98 (1958);
R.Schwyzer und P.Sieber,
diese Z. 42, 972-77 (1959) und 43, 1910-15 (1960)
- (85) C.Birr in Peptides 1974, Vortrag zum 13. Europä-
ischen Peptid-Symposium in Kiryat Anavim (Israel) 1974;
T.Wieland, C.Birr und H.Wissenbach,
Angew.Chem. 81, 782-83 (1969);
C.Birr, F.Flor, P.Fleckenstein und T.Wieland in
loc.cit.(16), S. 175-84;
T.Wieland und C.Birr,
Liebigs Ann.Chem. 757, 136-46 (1972);
C.Birr, W.Lochinger, G.Stahnke und P.Lang,
Liebigs Ann.Chem. 763, 162-72 (1972);
C.Birr in loc.cit.(20), S. 72-77;
C.Birr, Liebigs Ann.Chem. 764, 1652-62 (1973)
- (86) E.Schnabel, H.Herzog, P.Hoffmann, P.Klauke und I.Ugi,
Ann.Chem. 716, 175-185 (1968)
- (87) A.Patchornik, B.Amit und R.B.Woodward in
loc.cit.(32), S. 12-16
- (88) T.Wieland und B.Heinke, Angew.Chem. 69, 362-71 (1957);
T.Wieland, diese Z. 71, 417-21 (1959);
T.Wieland und H.Determann, diese Z. 75, 539-51 (1963);
- (89) M.Bergmann und L.Zervas, Ber. 65, 1192-1201 (1932)
- (90) F.C.McKay und N.F.Albertson,
J.Am.Chem.Soc. 79, 6180-83 (1957)
- (91) loc.cit.(83), S. 47-69 und S. 117-132
- (92) E.Schnabel in E.Bricas, ed., Peptides 1968, S. 91-7,
North-Holland Publ.Comp., Amsterdam 1968
- (93) A.Choppin und J.Rogers,
J.Am.Chem.Soc. 70, 2967 (1948);
R.B.Woodward et al., diese Z. 88, 852-53 (1966)
- (94) F.McKay und N.F.Albertson,
J.Am.Chem.Soc. 79, 4686-90 (1957)
- (95) G.W.Anderson und A.C.McGregor,
J.Am.Chem.Soc. 79, 6180-83 (1957)
- (96) M.Frankel, D.Ladkany, C.Gilon und Y.Wolman,
Tetrahedron Lett., 4765-68 (1966)

- (97) H.Groß und L.Bilk, Angew.Chem. 79, 532-33 (1967)
- (98) W.Broadbent, J.S.Morley und B.E.Stone,
J.Chem.Soc. (C), 2632-36 (1967)
- (99) T.Nagasawa, K.Kuroiwa, K.Narita und Y.Isowa,
Bull.Chem.Soc.J. 46, 1269-72 (1973)
- (100) R.Schwyzer, P.Sieber und H.Kappeler,
Helv.Chim.Acta 42, 2622-24 (1959)
- (101) E.Schnabel, Liebigs Ann.Chem. 702, 188-96 (1967)
- (102) K.Okawa, Bull.Chem.Soc.J. 30, 976-78 (1957)
- (103) E.Wünsch und J.Jentsch, Chem.Ber. 97, 2490-96 (1964)
- (104) Y.Murasa, K.Okawa und S.Akabori,
Bull.Chem.Soc.J. 33, 123-24 (1960)
- (105) T.Mizoguchi et al., J.Org.Chem. 33, 903-904 (1968)
- (106) S.Sakakibara et al. in loc.cit.(55), S. 44-49
- (107) R.Hirschmann et al., J.Am.Chem.Soc. 91, 502-08 (1969)
- (108) W.Grassmann und E.Wünsch,
Chem.Ber. 91, 462-65 (1958)
- (109) J.Meienhofer, Chemtech. 242-54 (1973)
- (110) J.R.McDermott und N.L.Benoiton,
Canad.J.Chem. 51, 2555-61 (1973)
- (111) H.Nesvadba und H.Roth,
Monatsh.Chem. 98, 1432-36 (1967)
- (112) loc.cit.(72), S. 56-58
- (113) J.P.Greenstein und M.Winitz:
Chemistry of the Amino Acids, Vol. 3, S. 1920,
J.Wiley & Sons Inc., New York-London 1961
- (114) I.Photaki, J.Chem.Soc. (C), 2687-89 (1970)
- (115) R.G.Hiskey et al., J.Org.Chem. 35, 513-15 (1970)
- (116) H.Zahn und K.Hammerström,
Chem.Ber. 102, 1048-52 (1969)
- (117) K.Hofmann et al., J.Am.Chem.Soc. 94, 6170-78 (1972)
- (118) I.Photaki et al., J.Chem.Soc. (C), 2683-86 (1970)
- (119) R.G.Hiskey und J.B.Adams,
J.Org.Chem. 30, 1340 (1965);
R.G.Hiskey et al., diese Z. 36, 488-90 (1971)
- (120) P.J.E.Pimlott und G.T.Young,
Proc.Chem.Soc.(London), 257 (1958)

- (121) D.F.Veber, J.D.Milkowski, R.G.Denkewalter und R.Hirschmann, *Tetrahedron Lett.* 26, 3057-58 (1968)
- (122) P.Marbach und J.Rudinger, *Helv.Chim.Acta* 57, 403-14 (1974)
- (123) P.Hermann und E.Schreier in *loc.cit.*(20), S. 126-27 und *J.prakt.Chem.* 316, 719-28 (1974)
- (124) P.Sieber, B.Kamber, A.Hartmann, A.Jöhl, B.Riniker und W.Rittel, *Helv.Chim.Acta* 57, 2617-21 (1974)
- (125) D.F.Veber, J.D.Milkowski, S.L.Varga, R.G.Denkewalter und R.Hirschmann, *J.Am.Chem.Soc.* 94, 5456-61 (1972)
- (126) M.Dixon und F.C.Webb: *Enzymes* Academic Press, New York 1964
- (127) J.M.Swan, *Nature* 180, 643-45 (1957)
- (128) N.Inukai, K.Nakano und M.Murakami, *Bull.Chem.Soc.J.* 40, 2913-18 (1967) und 41, 182-86 (1968)
- (129) A.Fontana, E.Scoffone und C.A.Benassi, *Biochem.* 7, 980-86 (1968)
- (130) U.Weber, *Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.* 350, 1421-24 (1969);
U.Weber, K.H.Herzog, H.Grossmann, S.Hörnle und G.Weitzel, *diese Z.* 350, 1425-29 (1969);
U.Weber und P.Hartter, *diese Z.* 351, 1384-88 (1970);
U.Weber, K.H.Herzog, H.Grossmann, P.Hartter und G.Weitzel, *diese Z.* 352, 419-29 (1971)
- (131) K.Lübke und H.Klostermeyer, *Advances in Enzymologie* 33, 445-525 (1970)
- (132) T.Wieland und H.Schwahn, *Chem.Ber.* 89, 421-28 (1956)
- (133) U.Weber, P.Hartter und L.Flohé, *Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.*, 351, 1389-94 (1970);
P.Hartter und U.Weber, *diese Z.* 354, 365-70 (1973)
- (134) A.P.Ryle und F.Sanger, *Biochem.J.* 60, 535-540 (1955)
- (135) R.E.Benesch und R.Benesch, *J.Am.Chem.Soc.* 80, 1666-69 (1958)
- (136) L.T.Haylett, *Biochem.J.* 108, 701-03 (1968)
- (137) E.Wünsch und R.Spangenberg in *loc.cit.*(32), S. 30-34

- (138) I.Photaki, J.Am.Chem.Soc. 88, 2292-99 (1966)
- (139) H.Lecher und M.Wittwer, Ber. 55, 1474-80 (1922)
- (140) R.G.Hiskey et al., J.Org.Chem. 26, 1152-55 (1961)
- (141) H.Zahn und E.Drechsel,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 349, 359-72 und
385-89 (1968)
- (142) W.W.Cleland, Biochem. 3, 480-82 (1964)
- (143) U.Weber und P.Hartter,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 351, 1384-88 (1970)
- (144) J.L.Bailey: Techniques in Protein Chemistry, S. 110-33,
Elsevier Publ.Comp., Amsterdam-London-New York 1967
- (145) G.F.Holland und L.A.Cohen,
J.Am.Chem.Soc. 80, 3765-68 (1958)
- (146) R.G.Hiskey und W.P.Tucher,
J.Am.Chem.Soc. 84, 4789-94 (1962)
- (147) E.Schwertner, Dissertation, TH-Aachen 1972
- (148) R.G.Hiskey und B.F.Ward jr.,
J.Org.Chem. 35, 1118-21 (1970)
- (149) A.Arold und M.Eule in loc.cit.(20), S. 78-85
- (150) H.Zahn und G.Schmidt,
Tetrahedron Lett.(London), 5095-98 (1967);
H.Zahn et al. in loc.cit.(92), S. 217-21
- (151) V.du Vigneaud und O.K.Behrens,
J.Biol.Chem. 117, 27 (1937)
- (152) H.Kappeler, Helv.Chim.Acta 44, 476-91 (1961);
R.Schwyzer und H.Kappeler, diese Z. 44,
1991-2002 (1961);
R.Schwyzer und P.Sieber, diese Z. 49, 134-58 (1966);
P.Sieber, W.Rittel und B.Riniker, diese Z. 55,
1243-48 (1972)
- (153) S.Bajusz und K.Medzihradszky in loc.cit.(55), S. 209-13
- (154) R.Geiger, K.Sturm und W.Siedel,
Chem.Ber. 96, 1080-87 und 97, 1197-1213 (1964);
R.Geiger, H.G.Schröder und W.Siedel,
Liebigs Ann.Chem. 726, 177-187 (1971);
R.Geiger, Liebigs Ann.Chem. 750, 165-170 (1971)

- (155) J.Meienhofer und K.Kuromizu,
Tetrahedron Lett. 37, 3259-62 (1974)
und J.Am.Chem.Soc. 96, 4978-81 (1974)
- (156) A.M.Felix, J.Org.Chem. 39, 1427-29 (1974)
- (157) S.Sakakibara, Y.Nobuhara, Y.Shimonishi und R.Kiyoi,
Bull.Chem.Soc.J. 38, 120-23 (1965)
- (158) H.Zahn, W.Danho, G.Schmidt, J.Dahlmans, A.Costopanagiotis
und E.Engels in loc.cit.(92), S. 217-21
- (159) E.Schaich und F.Schneider,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 939-44 und
945-51 (1974)
- (160) H.Zahn, W.Danho und B.Gutte,
Z.Naturforschg. 21 b, 763-73 (1966)
- (161) E.Schaich und F.Schneider,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 952-57 (1974)
- (162) H.Wilson und R.Cannan,
J.Biol.Chem. 119, 309 (1937)
- (163) J.B.Gilbert, V.E.Price und J.P.Greenstein,
J.Biol.Chem. 180, 209-18 (1949)
- (164) F.Schneider,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 320, 82-91 (1960)
- (165) E.Schnabel, H.Klostermeyer, J.Dahlmans und H.Zahn,
Liebigs Ann.Chem. 707, 227-41 (1967)
- (166) E.Schröder und K.Lübke in loc.cit.(69), S. 191-202
- (167) W.König und R.Geiger in loc.cit.(46), S. 343-350
- (168) M.Bodanszky et al., J.Am.Chem.Soc. 96, 2234-40 (1974);
J.Pless und R.A.Boissonnas,
Helv.Chim.Acta 46, 1609-25 (1963);
H.J.Goren, Eur.J.Biochem. 41, 263-72 (1974)
- (169) M.Goodman und K.C.Stueben,
J.Am.Chem.Soc. 84, 1279-83 (1962)
- (170) A.M.Williams und G.T.Young in loc.cit.(32), S. 52-53
- (171) G.L.Ellmann,
Arch.Biochem.Biophys. 82, 70-77 (1959)
- (172) R.G.Hiskey und J.B.Adams jr.,
J.Org.Chem. 31, 2178-83 (1966)

- (173) E.Schnabel, H.Klostermeyer und H.Berndt,
Liebigs Ann.Chem. 749, 90-108 (1971)
und loc.cit.(16), S. 69-76
- (174) P.Sieber und B.Iselin,
Helv.Chim.Acta 51, 614-21 (1968)
- (175) K.Noda, S.Terada und N.Izumiya,
Bull.Chem.Soc.J. 43, 1883-85 (1970)
- (176) R.B.Merrifield in loc.cit.(46), S. 191-95;
B.W.Erickson und R.B.Merrifield,
J.Am.Chem.Soc. 95, 3757-63 (1973)
- (177) D.Yamashiro, R.L.Noble und C.H.Li
in loc.cit.(46), S. 197-202;
D.Yamashiro und C.H.Li,
Intern.J.Pept.Prot.Res. 4, 181 (1972)
- (178) T.Devenyi und J.Gergely: Analytische Methoden zur
Untersuchung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen,
Methoden der Analyse in der Chemie Bd. 10, S. 203-05,
Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M. 1968
- (179) M.Bremer, A.Niederwieser und G.Pataki in E.Stahl:
Dünnschichtchromatographie,
Springer Verlag, Heidelberg 1962
- (180) F.Reindel und W.Hoppe, Chem.Ber. 87, 1103-07 (1954)
- (181) G.Pataki, J.Chromatogr. 12, 541 (1963)
- (182) H.Pauly, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 42, 517 (1904)
- (183) K.Randerath: Dünnschichtchromatographie, S. 114-32,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1965
- (184) Organikum, Org. Chemie Grundpraktikum, S. 623,
Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1968
- (185) L.A.Carpino, J.Am.Chem.Soc. 79, 1916-17 (1948)
- (186) loc.cit.(113), S. 890
- (187) E.Wünsch und E.Jäger,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 346, 301-02 (1966)
- (188) A.Müller, M.Mészáros, M.Lempert-Sréter und J.Szára,
J.Org.Chem. 16, 1003-24 (1951)
- (189) A.Basler, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 16, 2714-20 (1883)
- (190) E.Sandrin und R.A.Boissonnas,
Helv.Chim.Acta 46, 1637-69 (1963)

- (191) K.Hofmann,R.Schmiechen,R.D.Wells,Y.Wolman und
N.Yanaihara,
J.Am.Chem.Soc. 87, 611-19 (1965)
- (192) J.Kovacs und R.L.Rodin,
J.Org.Chem. 33, 2418-20 (1968)
- (193) C.S.Pande,J.Rudick und R.Walter,
J.Org.Chem. 35, 1440-45 (1970)
- (194) E.Bayer,G.Jung und H.Hagenmaier,
Tetrahedron 24, 4853-60 (1968)
- (195) G.W.Anderson,J.E.Zimmerman und F.M.Callahan,
J.Am.Chem.Soc. 86, 1839-42 (1964)
- (196) Y.Wolman,D.Ladkany und M.Frankel,
J.Chem.Soc. (C), 689-90 (1967)
- (197) E.Schnabel, Liebigs Ann.Chem. 673, 171-75 (1964)
- (198) H.Schwarz und K.Arakawa,
J.Am.Chem.Soc. 81, 5691-95 (1959)
- (199) E.Wünsch und A.Zwick, Chem.Ber., 2497-2503 (1964)
- (200) R.H.Mazur und J.H.Schlatter,
J.Org.Chem. 28, 1025-29 (1963)
- (201) K.Lübke und E.Schröder,
Z.Naturforschg. 16 b, 765-67 (1961)
- (202) E.Schnabel,J.Stoltefuß,H.A.Offe und E.Klauke,
Liebigs Ann.Chem. 743, 57-68 (1971)
- (203) S.Hörnle,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 348, 1355-58 (1967)
- (204) K.Hofmann,W.Haas,M.J.Smithers und G.Zanetti,
J.Am.Chem.Soc. 87, 631-39 (1965)
- (205) B.Iselin,W.Rittel,P.Sieber et al.,
Helv.Chim.Acta 40, 373-87 (1957)
- (206) M.Itch, Chem.Pharm.Bull.(Tokyo),18, 784 (1970)
- (207) M.Goodman und K.C.Stueben,
J.Am.Chem.Soc. 81, 3980-83 (1959)
- (208) B.Iselin und R.Schwyzler,
Helv.Chim.Acta 43, 1760-66 (1960)
- (209) A.Wittinghofer, Liebigs Ann.Chem.,290-305 (1974)
- (210) M.Bodanszky et al. in loc.cit.(46), S. 203-07

Danksagung

Herrn Th.Stein danke ich für seine fleißige und sorgfältige Unterstützung bei der Nachsynthese zahlreicher Aminosäure- und Peptidderivate, die mir eine wertvolle Hilfe bedeutete.

Für die Durchführung eines großen Teils der C,H,N-Analysen danke ich Herrn Pfeiffer von der analytischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren:

Aurich, Ax, Bär, Berndt, Bock, Danzer, Dehnicke, Dimroth, Försterling, Follmann, Glemser, Hilsch, Hoffmann, Jost, Karlson, Kindl, Kirmse, Koch, Kuhn, Lorbert, Mahr, Maier, Nöth, Nultsch, Perst, Petry, Reichardt, Schäfer, Schmid, Schneider, Schweig, Seelig, Senger, Stuke, Walcher, Witzel, Zilliken

Lebenslauf

Am 6. September 1946 wurde ich, Andreas Raschig, als zweiter Sohn des Regierungsrates Wolfgang Raschig und seiner Ehefrau Ilse Raschig, geborene Eckstein, in Hofgeismar geboren.

Ich besuchte dort ab April 1953 die Volksschule und ab Januar 1955 nach einer Versetzung meines Vaters an die Landesfinanzschule Hessen in Rotenburg/Fulda die dortige Volksschule. Ab Ostern 1958 besuchte ich das Gymnasium, die Jakob-Grimm-Schule in Rotenburg. Nach einer weiteren Versetzung meines Vaters nach Wiesbaden ging ich ab November 1960 in das Wiesbadaner Realgymnasium, die Oranien-schule, bis zum Abitur im Juni 1967.

Im Oktober 1967 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen, welches ich im April 1968 an der Philipps-Universität Marburg fortsetzte. Am 23. Oktober 1969 legte ich das Diplom-Vorexamen ab und bestand am 10. Februar 1972 das Diplom-Hauptexamen für das Fach Chemie.

Meine Diplomarbeit fertigte ich im Physiologisch-chemischen Institut in Marburg in der Zeit vom 1.4.1972 bis 31.12.1972 an. Anschließend begann ich mit den Arbeiten zur Dissertation, die ich im April 1975 abschließen konnte.

